



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação do envolvimento das bombas de efluxo na
fármaco-resistência ao Praziquantel em *Schistosoma*
mansoni

Autor: Tiago Manuel Fernandes Mendes

Orientadora: Prof^a. Doutora Silvana Belo

Co-orientadores: Inv^a. Doutora Ana Afonso e Inv^a. Dr^a Ana Armada

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação

Artigos publicados

- Mendes T., Calado M., Belo S., Afonso A. Genetic analysis of *Schistosoma mansoni* sensitive and resistant to Praziquantel strains by *RAPD-PCR*. Anais do IHMT. 2013; 12: 41-45

Participações em congressos

Comunicações Orais

- Prémio “Dr. Luiz Augusto Magalhães” como trabalho destaque apresentado Oral no VII Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, S. Carlos – SP, 14 – 16 de novembro de 2014
Mendes, T.; Pinto-Almeida, A.; Armada, A.; Viveiros, V.; Belo, S.; Afonso, A.. Avaliação do envolvimento das bombas de efluxo na fármacoresistência ao Praziquantel em *Schistosoma mansoni*. VII Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, 14 – 16 de novembro de 2014
- Mendes T., Calado M., Belo S., Afonso A. Genetic analysis of *Schistosoma mansoni* sensitive and resistant to Praziquantel strains by *RAPD-PCR*. XVI Congresso Português de Parasitologia, Lisboa, 29-30 de Novembro de 2012 Acta Parasitológica Portuguesa, 19 (1/2):18-19

Posters

- Mendes T., Calado M., Belo S., Afonso A. Genetic profiles of *Schistosoma mansoni* sensitive and resistant strains to Praziquantel using *RAPD-PCR*. 13º Simpósio Internacional sobre Esquistossomose, Belo Horizonte, MG, Brasil, 16 a 19 de Setembro de 2012

À minha mãe

Por todo o seu amor, carinho e apoio.

Por seres uma fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho foi possível graças ao envolvimento, directo ou indirecto de várias pessoas, as quais deixo os meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora, a Professora Doutora Silvana Belo, por todos os ensinamentos e pela sua disponibilidade na orientação deste.

À minha co-orientadora, a Investigadora Doutora Ana Afonso por todo o apoio e ensinamentos que me deu, sendo, para mim, uma inspiração não só a nível profissional como a nível pessoal.

À minha co-orientadora, a Investigadora Doutora Ana Armada, pelas sugestões de trabalho, pela motivação e entusiasmo, paciência, dedicação e disponibilidade em esclarecer qualquer questão que tenha surgido ao longo do trabalho.

Ao Mestre António Pinto com quem tive o prazer de trabalhar lado a lado durante os últimos dois anos como equipa e com que travei uma grande amizade.

Ao Doutor Pedro Ferreira e à Mestre Cátia Ferreira por todo o apoio, motivação, disponibilidade, animação e amizade durante todo o meu percurso no IHMT.

À Professora Doutora Manuela Calado e à Professora Doutora Isabel Maurício por todos os ensinamentos.

Aos meus colegas de mestrado, em particular ao José Manuel Cristóvão com quem tive o prazer de trabalhar lado a lado cuja amizade e simpatia tanto significaram.

À Técnica Especialista Isabel Clemente pelo apoio prestado, por toda a disponibilidade, simpatia, rigor, e motivação.

Ao Filipe, à Carla e à Susana que há mais de dez anos me apoiam e os quais considero família, por toda a motivação, amizade, por estarem sempre prontos para me ajudar e por serem as “minhas pessoas”.

À Margarida, à Ana, à Sofia e à Catarina, que tive o prazer de conhecer e travar amizade na minha licenciatura e cujo apoio sempre teve grande importância para mim.

À minha Mãe, que sempre me apoiou incondicionalmente e cuja coragem e forma de encarar a vida me servem de inspiração de formas que ela própria não imagina.

Ao meu Pai pelo apoio que me deu e por estar sempre disponível para me ajudar.

A todos aqueles cujo nome não referi mas que me apoiaram ao longo de todo o meu percurso e cuja presença tornou a minha vida melhor, na ausência de melhores palavras, a todos deixo um grande obrigado.

Resumo

O Praziquantel (PZQ) é o fármaco de primeira linha no tratamento da schistosomose, com alta taxa de cura e sem efeitos secundários significativos. Têm sido reportados cada vez mais casos de resistência ou de aumento de tolerância a este fármaco, aumentando as preocupações de emergência de estirpes resistentes ao PZQ. O Verapamil, um bloqueador de canais de cálcio, inibe o fluxo de fármaco activo e tem sido descrito como um bom inibidor das glicoproteínas-P (P-gp), sendo, por isso, utilizado em diversos estudos de fármaco-resistência.

No laboratório de Helminologia da Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, foi seleccionada uma linha de *S. mansoni*, resistente a 800 mg/Kg de PZQ, após pressão de fármaco constante e crescente ao longo de vários ciclos. Para confirmar a existência de diferenças polimórficas entre a estirpe sensível e resistente de *S. mansoni*, extraiu-se o DNA de parasitas adultos de ambas as estirpes de *S. mansoni* e analisou-se por *Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR). As diferenças polimórficas entre a estirpe sensível e a resistente foram observadas e calculou-se o coeficiente de similaridade (*Dice's coefficient*).

Após confirmar a existência de polimorfismos entre as duas estirpes, a atividade das bombas de efluxo foi avaliada em ambas as estirpes. A avaliação foi realizada num ensaio de acumulação usando o composto Brometo de Etídio na presença e ausência de Verapamil.

O papel das bombas de efluxo na resistência ao PZQ, foi ainda investigado comparando a resposta dos parasitas da estirpe sensível e resistente ao fármaco na ausência e na presença de diferentes doses de Verapamil, em cultura *in vitro*.

Os resultados obtidos foram reforçados comparando os níveis e expressão do gene *SmMDR2* em ambas as estirpes isogénicas por Real-Time PCR (qPCR).

A estirpe resistente de *S. mansoni*, necessitou de concentrações mais elevadas de inibidor quando comparada com a estirpe sensível para obter níveis significativos de fluorescência de Brometo de Etídio.

A cultura *in vitro* mostrou uma dose letal de PZQ mais elevada na estirpe resistente do que na estirpe sensível na ausência de Verapamil. Na presença de Verapamil houve uma redução na dose letal de PZQ nos machos de ambas as estirpes, sendo esta redução mais acentuada nos machos da estirpe resistente. As fêmeas não mostraram alterações significativas na dose letal de PZQ na presença e ausência de inibidor. Os resultados foram reforçados pela observação dos níveis do gene *SmMDR2*, onde os machos da estirpe resistente mostraram ter os maiores níveis de expressão e pelo aumento de expressão nos machos de ambas as estirpes após exposição ao PZQ. As fêmeas de ambas as estirpes não tiveram diferenças significativas na expressão do gene após exposição ao PZQ e as fêmeas da estirpe resistente tiveram mostraram ter os níveis de expressão do gene *SmMDR2* mais baixos entre os machos e fêmeas de ambas as estirpes.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os machos da estirpe resistente têm maior atividade de bombas de efluxo do que os machos da estirpe sensível e que as bombas P-gp estão envolvidas na resposta e no aumento de tolerância dos machos de *S. mansoni* ao PZQ.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; fármaco-resistência; glicoproteínas-P; Praziquantel

Abstract

Praziquantel (PZQ) is the drug of choice in the treatment of schistosomiasis due to its high cure rates and no significant side effects. Currently, more and more cases of resistance or increased tolerance to PZQ have been reported, growing concerns regarding the emergency of resistant strains. Drug resistance in helminths may involve efflux pumps such as members of ATP-binding cassette transport proteins, including P-glycoproteins (P-gps) coded by the *SmMDR2* gene in *S. mansoni*. Verapamil has been described as a P-gp inhibitor, therefore, it has been used in several drug-resistance studies.

In our laboratory, we selected a parasitic line of *S. mansoni*, through constant drug pressure over several cycles, which was resistant to 800 mg/kg PZQ. To confirm the existence of polymorphic differences between the resistant and sensitive strain of *S. mansoni*, the DNA of adult parasites of *S. mansoni* from both strains was extracted and analyzed through Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR). The polymorphic differences between susceptible and resistant parasites were observed and the similarity coefficient (Dice's coefficient) was calculated.

After confirming the existence of polymorphisms between strains, the efflux pumps activity was evaluated in both strains. The evaluation was performed through an ethidium bromide accumulation assay in the presence and absence of Verapamil (P-gp inhibitor). The role of efflux pumps in resistance to PZQ was, further investigated comparing the response of the parasites of the susceptible and resistant strain to PZQ in the absence and presence of different doses of Verapamil, in *in vitro* culture.

The results were reinforced through comparison of the expression levels of the *SmMDR2* (coding for P-gp) gene in both isogenic strains by qPCR.

The resistant strain of *S. mansoni* required higher concentrations of inhibitors than the sensitive strain in order to obtain significant levels of ethidium bromide retention.

The *in vitro* culture showed a higher lethal dose of PZQ in the resistant strain in the absence of Verapamil. In the presence of Verapamil there was a decrease in the lethal dose of PZQ in males of both strains, being that reduction more evident in the males of the resistant strain. Females did not show significant changes of lethal dose of PZQ in the presence of inhibitor. These results were corroborated by the observation of the levels of *SmMDR2* gene, where the males of the resistant strain showed the highest expression levels and by an increase of gene expression after exposure to PZQ in males of both strains. Females of both strains showed no significant changes in gene expression after exposure to PZQ, and the females of the resistant strain showed the lowest levels of *SmMDR2* expression between males and females of both strains.

The results obtained in this work showed that the males of the resistant strain have a higher efflux pump activity than the males of the sensitive strain, and that, in males, this activity is related with the response and increase of tolerance to PZQ.

Key-words: *Schistosoma mansoni*; Drug resistance; glycoproteins-P; Praziquantel

Índice

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. Introdução	1
1.1. Schistosomose	3
1.1.1. Nota Histórica	3
1.1.1. Taxonomia	4
1.1.2. Epidemiologia	5
1.1.3. Ciclo de vida e biologia do parasita	7
1.1.4. Hospedeiros Intermediários	10
1.1.5. Patologia.....	11
1.1.6. Diagnóstico	12
1.1.7. Tratamento e Controlo	14
1.1.8. Fármaco-resistência.....	14
1.2. Bombas de Efluxo	15
1.2.1. Bombas de efluxo e os Helmintas	17
1.2.2. Bombas de efluxo e o <i>Schistosoma</i>	20
1.3. Objectivo.....	21
2. Material e Métodos	23
2.1. Obtenção da estirpe resistente.....	25
2.1.1. Modelo Animal	25
2.1.2. Parasitas	25
2.1.3. Seleção do fenótipo de resistência ao Praziquantel.....	26
2.1.4. Método de Telemann-Lima.....	27
2.2. RAPD-PCR	27
2.2.1. Extração de DNA	27
2.2.2. Condições de PCR.....	28
2.2.3. Análise de perfis electroforéticos	29
2.3. Ensaio de acumulação de Brometo de Etídio.....	29
2.4. Ensaio de susceptibilidade ao PZQ <i>in vitro</i>	30
2.5. Real-time-PCR	31
2.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	31
2.5.2. Condições de qPCR.....	32

3.	Resultados	35
3.1.	RAPD-PCR	37
3.2.	Ensaio de acumulação de Brometo de Etídio	38
3.3.	Ensaio de susceptibilidade ao PZQ in vitro	43
3.3.1.	Machos Estirpe Sensível	43
3.3.2.	Machos Estirpe Resistente	45
3.3.3.	Fêmeas Estirpe Sensível.....	46
3.3.4.	Fêmeas Estirpe Resistente.....	48
3.4.	Real-time-PCR	48
4.	Discussão e conclusão.....	51
5.	Referências Bibliográficas	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – ATP-binding cassette

a.C – Antes de Cristo

ATP – Adenosina trifosfato

BH – Belo Horizonte

CTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio- *Cetyl trimethylammonium bromide*

Disability Adjusted Life Years – DALYs

DL – Decreto lei

DL50 – Dose necessária para uma mortalidade de 50%

DL90 – Dose necessária para uma mortalidade de 90%

DL99 – Dose necessária para uma mortalidade de 99%

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético- *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA – Ensaio Imunoenzimático- *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ER – Estirpe Tolerante/resistente ao PZQ

ES – Estirpe Sensível ao PZQ

EtBr – Brometo de Etídio

P-gp – glicoproteína-P

MDR – Multidrug Resistant

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase-*Polymerase Chain Reaction*

PZQ – Praziquantel

qPCR – Real-time PCR

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RNA – Ácido ribonucleico

SMDR2 – *Schistosoma* spp Multidrug Resistant associated protein 2

SmMDR2 – *Schistosoma mansonii* Multidrug Resistant associated protein 2

SMRP1 – *Schistosoma* spp Multidrug resistance-associated protein 1

TE – Tris-EDTA

1. Introdução

1. Introdução

1. Introdução

1. Introdução

1.1.Schistosomose

O termo schistosomose é utilizado na nomenclatura científica para descrever uma doença crónica causada por tremátodes do género *Schistosoma* que vivem nos vasos sanguíneos dos mamíferos (1-4). Conhecem-se 23 espécies dentro deste género das quais, sete têm capacidade de infectar o ser humano, nomeadamente *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma malayensis* e *Schistosoma guineensis*, tendo, as três primeiras espécies, maior relevância médica, sendo responsáveis pela grande maioria dos casos e tendo a maior distribuição (5-10).

O impacto socio-económico provocado pela morbilidade e mortalidade desta doença é apenas ultrapassado pela malária entre as doenças parasitárias, na África Sub-Saariana (11). Estima-se que 249 milhões de pessoas se encontrem em risco de infeção em 76 países; no ano de 2012, foram reportados 42,1 milhões de casos tratados, tendo este valor aumentado em 40% em relação ao ano de 2011 (12). Estimam-se que ocorram 200.000 mortes por ano diretamente associadas à schistosomose (2).

1.1.1. Nota Histórica

Desde tempos remotos que várias alterações urológicas como a hematúria crónica têm sido descritos no Egipto e Mesopotâmia, tendo a hematúria sido descrita em Papirus de Kahun por volta do ano 1900 a. C. e ovos calcificados de *Schistosoma haematobium* foram encontrados nos rins de duas múmias da vigésima dinastia (1250-1000 a.C) (13). Contudo só em 1851 o agente etiológico da doença foi descrito pelo cirurgião alemão Theodore Bilharz, durante uma observação pós-morte de uma veia mesentérica num hospital do Cairo (4).

Em 1902 Manson encontrou ovos com esporão lateral nas fezes de um doente indiano em Londres e colocou a hipótese da existência de uma segunda espécie (14). Em 1904, a espécie *S. mansoni* foi descoberta no Brasil e em 1906 na Venezuela (15).

No ano de 1904, em Hiroshima (Japão), foram recolhidos parasitas adultos de *S. japonicum* do sistema porta de um gato, tendo os moluscos anfíbios do género

1. Introdução

Oncomelania sido identificados como hospedeiro intermediário na China em 1924 (4, 15).

Em 1934 foi descoberta a espécie *S. intercalatum* no Zaire e em 1978 numa área restrita de Laos e Camboja foi descoberto o parasita *S. mekongi* (4, 16).

Schistosoma malayensis foi descrito em 1988, numa área estrita da Malásia, sendo originalmente descrito como um parasita de ratos e tendo recentemente sido encontrado em humanos (16).

Na segunda década do século XX iniciou-se o tratamento da schistosomose com sais de antimónio administrados por via parental. A sua utilização foi abandonada nas décadas de 1940 e 1950 quando foram publicados estudos que demonstravam que estes sais causavam muitos efeitos secundários e tóxicos, podendo mesmo levar à morte (17).

Na década de 1960 a Oxamniquina foi desenvolvida pela farmacêutica Pfizer (Sandwich, Inglaterra). Este fármaco era inicialmente administrado por via intramuscular, sendo mais tarde desenvolvido para administração por via oral (17).

O Praziquantel (PZQ) foi desenvolvido na década de 1970 pelos laboratórios Merck (Darmstadt, Alemanha) em colaboração com a empresa Bayer. Este fármaco apresentava taxas de cura superiores à Oxamniquina e era mais barato, o que levou ao abandono da utilização deste último (2, 17-19).

1.1.1. Taxonomia

A classificação taxonómica do género *Schistosoma*, encontra-se identificada abaixo:

Reino: Animalia

Filo: Platyhelminthes

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Strigeiforme

Superfamília: Schistosomatoidea

Família Schistosomatidae

Género *Schistosoma*

1. Introdução

A família Schistosomatidae é representada por parasitas que na fase adulta vivem no sistema venoso de mamíferos, répteis e aves. Os parasitas desta família diferenciam-se por serem dióicos, eliminarem ovos embrionados não operculados, com espigão terminal ou lateral e por terem como formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (definitivo), as cercárias, que penetram por via transcutânea (20, 21).

Tendo em consideração as características morfológicas dos parasitas adultos, do espigão do ovo, do ciclo biológico, da especificidade pelo hospedeiro e pelas características genéticas, as espécies do género *Schistosoma* podem ser divididas em quatro grupos (5, 21):

Grupo *japonicum* (*S. japonicum*, *Schistosoma sinensium*, *Schistosoma mekongi*, *S. malayensis*);

Grupo *haematobium* (*S. haematobium*, *Schistosoma bovis*, *Schistosoma mattheei*, *Schistosoma margrebowiei*, *S. intercalatum*, *Schistosoma leiperi*);

Grupo *indicum* (*Schistosoma indicum*, *Schistosoma spindale*, *Schistosoma incognitum*, *Schistosoma nasale*);

Grupo *mansoni* (*S. mansoni*, *Schistosoma rodhaini*, *Schistosoma hippopotami*, *Schistosoma edwardsi*).

1.1.2. Epidemiologia

A schistosomose é actualmente uma doença endémica em 76 países tropicais e subtropicais, com focos primários em África, Ásia e América do Sul, atingindo, em particular comunidades pobres sem acesso a água potável e a boas condições sanitárias (7, 22-24).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 249 milhões de pessoas estejam infectadas a uma escala mundial, estando 732 milhões em risco de infecção. No entanto a falha de diagnóstico, principalmente em casos de co-infecção com outros parasitas como plasmódios ou os ancilostomídeos, leva a que o número de casos seja subestimado,

1. Introdução

sendo sugerido que o número real de pessoas infectadas esteja entre os 391 e 587 milhões, com perdas anuais de entre 1.7 e 4.5 milhões de perda de anos vida ajustados por incapacidade (*Disability Adjusted Life Years* - DALYs) (12, 22, 25-27).

A grande maioria dos casos de schistosomose ocorre na África Subsariana (80-85%) onde as espécies *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. intercalatum* são endêmicas, contudo as duas principais espécies causadoras da doença são *S. haematobium*, agente etiológico da schistosomose urogenital e *S. mansoni* que responsável pela forma intestinal (7, 11, 26-28).

A transmissão da schistosomose é determinada pelos efeitos inter-relacionados das condições ambientais, climáticas, biológicas, políticas, demográficas, económicas, sociais e culturais (22-24). As alterações ecológicas resultantes do desenvolvimento de recursos hidroeléctricos e a deslocação de populações, são também determinantes importantes na epidemiologia da schistosomose (2, 24).

A schistosomose afecta pessoas de todos os grupos etários, incluindo crianças abaixo dos 5 anos de idade. No entanto a schistosomose tem um padrão etário de prevalência e intensidade, que atinge um pico entre os 10 e 19 anos, diminuindo com o aumento da idade (12, 22, 29).

A distribuição dos parasitas de *Schistosoma* encontra-se fortemente associada à distribuição geográfica dos moluscos (caracóis) que actuam como hospedeiros intermediários, específicos a cada espécie de parasita (2, 4, 7, 30). As espécies de *Schistosoma* eram originalmente caracterizadas em quatro grupos principais consoante a sua distribuição geográfica, especificidade do hospedeiro e da morfologia do ovo (5, 31). Dois grupos foram encontrados originalmente na Ásia, o grupo *S. japonicum* na região ocidental e sudoeste do continente, incluindo a China, as Filipinas e a Malásia, e o grupo *S. indicum*, sem importância médica para o Homem, encontrada na região oriental e sudeste da Ásia, nomeadamente na Índia, Sri Lanka e Tailândia (5). Ambos os grupos de *S. mansoni* e *S. haematobium* são encontrados em África e partilham frequentemente áreas geográficas comuns, no entanto, apenas uma espécie de *Schistosoma* pode ser encontrada na América do Sul, a espécie *S. mansoni*, restrita a algumas áreas do Brasil, Venezuela, Suriname e Caraíbas (4, 5, 31).

1. Introdução

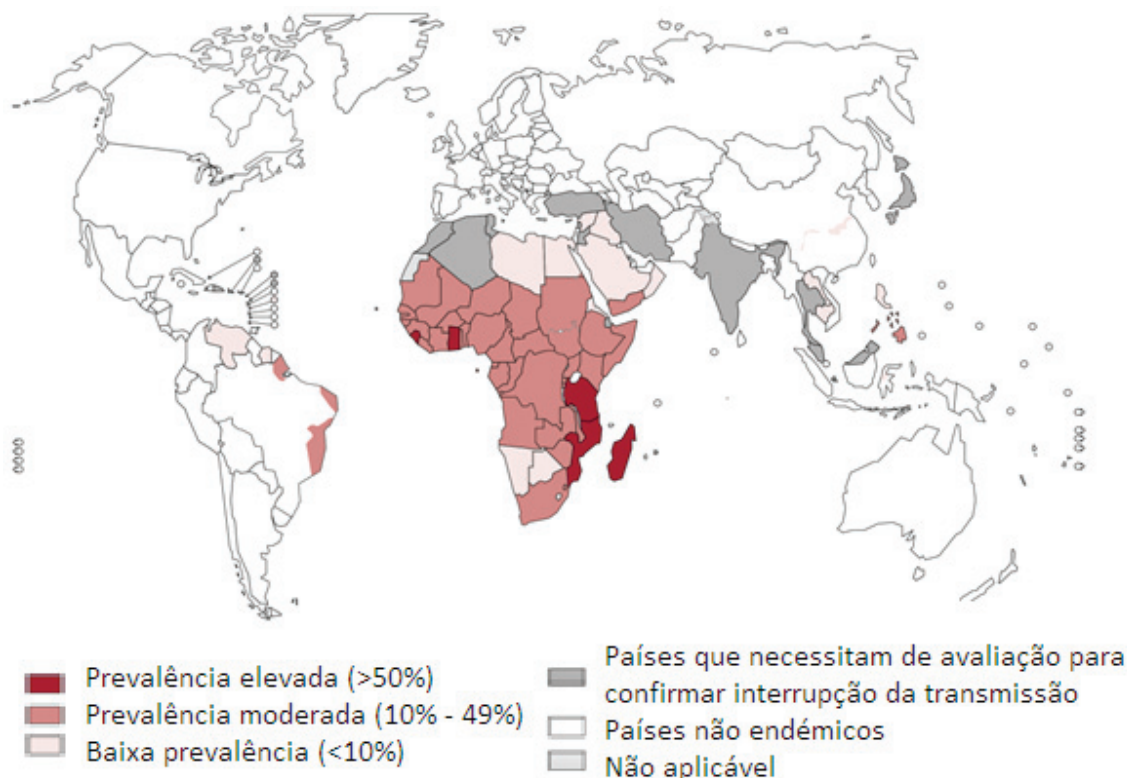


Figura 1 – Mapa de prevalência mundial de *Schistosoma* spp. (WHO, 2012)

A patologia da schistosomose pode-se manifestar de duas formas, consoante a espécie de parasita que infecta o hospedeiro, a schistosomose urogenital (*S. haematobium*) ou a schistosomose intestinal (*Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma malayensis* e *Schistosoma guineensis*) (11, 16, 28, 32, 33).

1.1.3. Ciclo de vida e biologia do parasita

O ciclo de vida de todas as espécies de *Schistosoma* envolve um hospedeiro intermediário, normalmente um molusco de água doce específico para cada espécie e um hospedeiro definitivo, o Homem (10, 31, 34, 35).

No ciclo de vida da espécie *S. mansoni*, os ovos são libertados para o ambiente através das fezes (10, 34, 35) (Figura 3 – 1). Os ovos são não operculados, têm um espigão lateral (Figura 2 – A), e possuem no seu interior uma larva ciliada assexuada denominada miracídio (Figura 2 – B). Na presença de água doce e temperatura adequada (10-30 °C), os miracídios eclodem (Figura 3 – 2) e nadam de forma activa guiados pela luz e por estímulos químicos, para encontrar e penetrar um caracol (hospedeiro intermediário)

1. Introdução

compatível (7, 10) (Figura 3 – 3). Após a penetração do caracol, a superfície ciliada do miracídio desaparece e o esporocisto mãe desenvolve-se perto do local de entrada, transformando-se num saco alongado cheio de células germinais e com pequenos vacúolos localizados (36, 37) (Figura 3 – 4). As células germinais desenvolvem-se em esporocistos secundários que migram para as glândulas digestivas onde se vão desenvolver, formando as cercárias. Como resultado desta multiplicação assexuada, formam-se milhares de cercárias todas do mesmo sexo e todas originárias dos mesmos miracídios (2, 31, 36, 37).



Figura 2 – A) Ovo de *Schistosoma mansoni*; B) Miracídio de *S. mansoni*; C) Cercária de *S. mansoni* (originais Tiago Mendes)

As cercárias, quando desenvolvidas, emergem do caracol como uma forma aquática de vida livre, adaptada à invasão do hospedeiro definitivo (2, 10, 35) (Figura 3 – 5). Possuem uma cauda bifurcada, não têm olhos ou faringe, com dimensões inferiores a um centímetro de comprimento, têm uma ventosa oral que ocupa cerca de um terço do corpo e uma pequena ventosa ventral (23, 37, 38) (Figura 2 – C). Seis pares de glândulas cefálicas promovem a saída do molusco e a penetração da pele do hospedeiro definitivo, auxiliada por secreções enzimáticas com funções adesivas à medida que a cercária se move na pele do hospedeiro (2, 23, 38) (Figura 3 – 6).

Após penetrarem a pele, as cercárias perdem as caudas e transformam-se noutra forma parasitária, o schistosómulo (Figura 3 – 7). Os schistosómulos atravessam os tecidos

1. Introdução

subcutâneos em 48 horas, penetram os canais venosos e são transportados para o lado direito do coração sendo em seguida levados para os pulmões através da artéria pulmonar (Figura 3 – 8). Dos pulmões os schistosómulos migram para o sistema porta-hepático, onde a maioria começa a alimentar-se de sangue e a desenvolver-se, movendo-se para vasos mais largos do sistema porta-hepático (2, 10, 34) (Figura 3 – 9). Os parasitas sofrem várias alterações metabólicas e uma vez transformados em adultos, perdem a capacidade de migração intravascular e ocorre o emparelhamento entre machos e fêmeas (2, 7) (Figura 3 – 10).

Os vermes adultos de *Schistosoma* possuem dimorfismo sexual, sendo o sexo definido por um par de cromossomas sexuais, onde a fêmea é heterogamética, com um par de cromossomas sexuais W e Z (5). Os machos têm em média 10 mm de comprimento, na região anterior possuem uma ventosa oral e uma ventosa ventral composta por músculos não somáticos (2). O sistema reprodutor dos machos é composto por seis a dez lóbulos testiculares situados logo abaixo da ventosa ventral, de onde sai um vaso eferente que se une à vesícula seminal, ligada ao poro genital por um canal seminal. O poro genital encontra-se no início do canal ginecóforo, onde o macho alberga a fêmea (7).

As fêmeas de *Schistosoma* apresentam um comprimento médio de 14 mm, duas pequenas ventosas (oral e ventral) e corpo filiforme (2, 4). O sistema reprodutor feminino é formado por um único ovário alongado, na metade anterior do corpo. Na parte mais estreita do ovário, os ovócitos são indiferenciados, com maturação progressiva à medida que se aproximam do oviduto. As glândulas vitelinas ocupam dois terços anteriores do corpo (7). Após o acasalamento, as fêmeas sofrem modificações estruturais e metabólicas, sendo o acasalamento fundamental para a maturação sexual das fêmeas (7, 21). A longevidade dos vermes adultos varia entre os 18 a 28 anos podendo mesmo ultrapassar os 30 anos (21).

Após os acasalamentos cada fêmea produz entre 100 a 300 ovos por dia, dos quais aproximadamente 50 % atravessam as paredes dos vasos, penetram no lúmen do intestino e são excretados nas fezes. Os restantes ovos são embolizados para o fígado, pulmões e outros tecidos onde ficam retidos, sendo estes responsáveis pelo estímulo da resposta imune e pela patologia (2, 10, 38-42)

1. Introdução

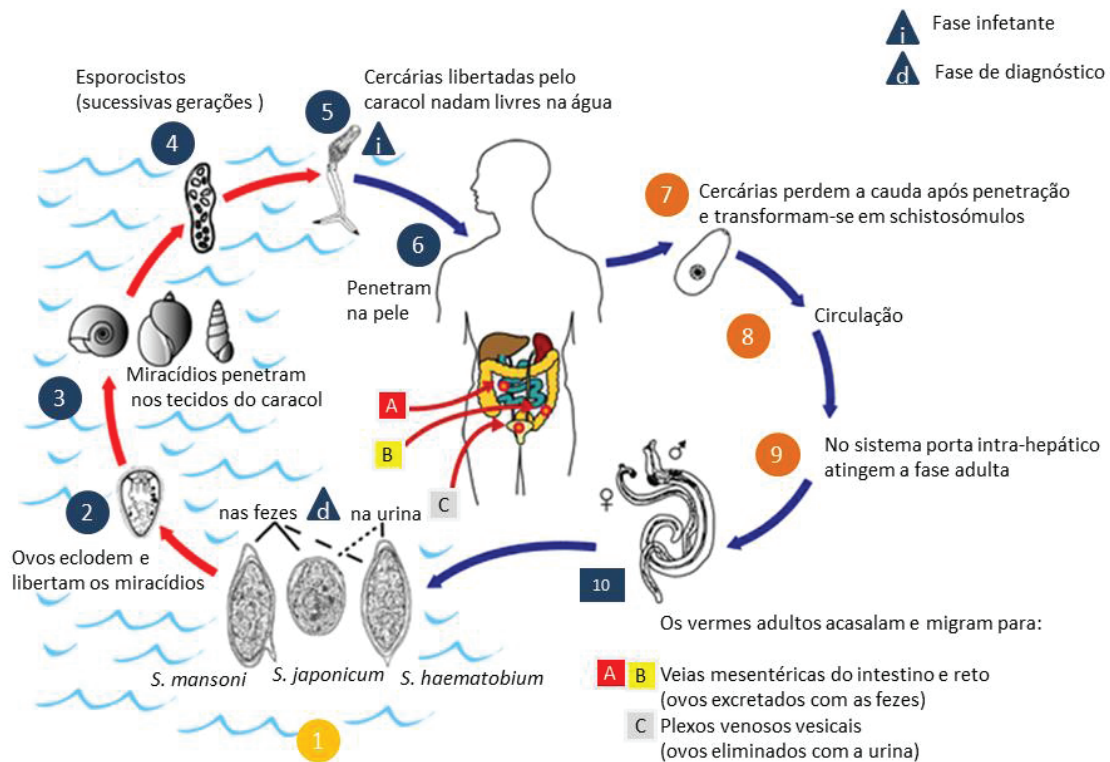


Figura 3 – Ciclo de vida de *Schistosoma* spp. (Autorizada adaptação de CDC-DPDx)

1.1.4. Hospedeiros Intermediários

A distribuição geográfica da schistosomose está directamente ligada à distribuição dos moluscos, hospedeiros intermediários, essenciais ao ciclo de vida do parasita (2, 4, 7, 30).

Schistosoma haematobium é transmitido por cerca de 30 espécies de moluscos pertencentes ao género *Bulinus*, classificados em quatro grupos. As espécies do grupo *Bulinus africanus* servem de hospedeiros intermediários para *S. haematobium* a sul do Sahara; as espécies do grupo *B. forskalli* e do complexo *B. truncatus/tropicus* estão presentes por todo o continente africano; as espécies do grupo *B. reticulatus* podem ser encontradas na Etiópia (43, 44).

Das duas estirpes de *S. intercalatum* biologicamente diferentes, uma é transmitida por moluscos do grupo *B. africanus* em áreas restritas do nordeste do Zaire e a outra estirpe por *B. forskalli* nos Camarões e Gabão. Cada estirpe é apenas capaz de se desenvolver nos moluscos pertencentes a um grupo e têm diferentes períodos de latência (4).

1. Introdução

O parasita *S. japonicum* é transmitido por moluscos anfíbios da espécie *Oncomelania hupensis* dividida em seis subespécies, *O. h. hupensis* na China, *O. h. quadrasi* nas Filipinas, *O. h. nosophora* no Japão, *O. h. lindoensis* na Indonésia e *O. h. chiui* em Taiwan. A espécie *S. mekongi* é transmitida por *Tricula aperta* (45).

Quanto o parasita *S. mansoni* é transmitido por espécies do género *Biomphalaria* amplamente distribuídas por África, Sul dos Estados Unidos, Brasil, Suriname e Venezuela (4, 30). Em África são reconhecidos quatro grupos de espécies, o grupo *Biomphalaria pfeifferi* com espécies distribuídas a sul de toda a África subsariana, o grupo *B. choanomphala* restrito a algumas áreas dos grandes lagos naturais africanos, o grupo *B. alexandrina* comum no Sudão e Egito e *B. sudanica* com espécies na África oriental e ocidental (30, 43, 46, 47). Na América do Sul apenas três espécies de *Biomphalaria* servem de hospedeiro intermediário para as espécies de *S. mansoni*, *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (30, 47-49).

1.1.5. Patologia

Na schistosomose a principal causa de patologia são os ovos acumulados nos tecidos (2, 10, 31, 38, 40, 42, 46). Alguns indivíduos permanecem assintomáticos, enquanto outros podem sofrer patologia irreversível, dependente de factores imunológicos, idade, sexo e duração da exposição. A sintomatologia clínica pode ser dividida em três categorias, dependendo da fase de infecção, sendo estas categorias a dermatite cercariana, schistosomose aguda e schistosomose crónica (50).

A dermatite cercariana ocorre como uma reacção imediata após a penetração das cercárias, apresentando-se inicialmente como lesões eritematosas e passando a uma erupção maculopapular. A lesão desaparece 5 a 7 dias após a infecção, sendo rara em indivíduos que vivem em áreas endémicas (20).

A schistosomose aguda ocorre devido a uma reacção de hipersensibilidade contra os schistosómulos. Inicia-se 3 a 9 semanas após a infecção podendo ocorrer tanto em infecções leves como em infecções intensas (7). Após os schistosómulos passarem à fase adulta e acasalamento, começa a produção de ovos, ficando cerca de 50% retidos nos

1. Introdução

tecidos onde vão mediar uma resposta imunitária que causa uma inflamação granulomatosa. A resposta a esta reacção inflamatória causa uma síndrome febril com alterações sistémicas denominada Síndrome de Katayama (51). Os indivíduos podem ter fígado aumentado e em algumas ocasiões baço ligeiramente aumentado. Outros sintomas associados à schistosomose aguda incluem dores abdominais intermitentes, febre, eosinofilia elevada, cefaleias, perda de apetite e de peso, náuseas, vómitos, retrorragias e dores musculares (51). A fase aguda dura entre 14 a 21 dias, afectando principalmente pessoas de áreas não endémicas (50).

A fase crónica tem início quando os ovos que ficaram retidos são transportados para o fígado através da circulação portal, onde ficam retidos (10). Os miracídios em desenvolvimento nos ovos libertam enzimas proteolíticas através de pequenos poros na casca do ovo, que vão dar origem a inflamações eosinofílicas e reacções periovulares que resultam na formação do granuloma (10, 41). Quando o miracídio no ovo morre, a carga de antigénio diminui e o granuloma por vezes decresce. A reparação da área lesada leva à formação de tecido fibroso em redor das vénulas do sistema porta (10, 41, 51).

A formação de granulomas e de tecido fibroso pode resultar em hepatoesplenomegalia e, consequentemente, no aumento da pressão portal, sendo esta alteração mais comum em crianças e adolescentes do que em adultos (10, 41). Após vários anos de infecção, os granulomas e tecido fibroso em redor das vénulas levam a uma redução do fluxo sanguíneo na circulação porta e ao desenvolvimento de hipertensão portal (10, 41, 51), podendo originar calcificações no fígado com, esplenomegalia e formação de varizes intestinais e esofágicas que, por ruptura podem causar hematemese fatal (10).

1.1.6. Diagnóstico

As técnicas de diagnóstico são essenciais para conhecer a distribuição de uma doença, monitorizar e avaliar intervenções de controlo, avaliar a eliminação da infecção e para vigilância (52, 53). A detecção directa de ovos de *Schistosoma* spp na urina (*S. haematobium*) e em amostras de fezes (*S. mansoni* e *S. japonicum*) sob microscopia é o método de diagnóstico mais utilizado em inquéritos epidemiológicos da schistosomose (6, 52, 53). O diagnóstico da schistosomose urogenital consiste na detecção e

1. Introdução

quantificação de ovos de *S. haematobium* em 10 mL de de urina após filtração (6). A técnica de Kato–Katz é a mais utilizada em inquéritos epidemiológicos da schistosomose intestinal, permitindo quantificar o número de ovos nas fezes e foi originalmente desenvolvida em meados de 1950 pelos investigadores japoneses Kato e Miura e mais tarde modificada por Naftale Katz e colegas no Brasil (6, 54, 55).

Em fases iniciais de programas de controlo, em que o objectivo é a redução da morbilidade, a prevalência e intensidade da infecção são normalmente elevadas, sendo os métodos de diagnóstico directos mais precisos (6, 52, 55). No entanto, quando a prevalência e intensidade de infecção diminuem através do tratamento, os métodos directos tornam-se menos sensíveis e devem ser reforçados ou substituídos por técnicas imunológicas com base na detecção de antígenos ou de anticorpos, ou através de ferramentas moleculares como a reacção em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) (6).

Embora o imunodiagnóstico necessite de mais equipamento laboratorial e mais conhecimentos do que as técnicas parasitológicas, possuem maior sensibilidade em particular para a detecção de anticorpos; no entanto a especificidade pode ser um problema na detecção de anticorpos devido a reacções cruzadas com outros tremátodes (6, 55). Além disso os níveis de anticorpos permanecem elevados durante períodos prolongados de tempo após o tratamento, não sendo assim possível diferenciar entre infecções activas e curadas (6).

A detecção de antígenos de *Schistosoma* através da técnica de imunoenzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays - ELISA) tem várias vantagens em relação à detecção de anticorpos. A principal vantagem é a detecção de infecções activas, por isso esta abordagem é mais vantajosa para avaliação da eficácia de anti-helmínticos devido à sua alta especificidade (6, 52, 55).

As ferramentas de diagnóstico molecular têm uma elevada sensibilidade e especificidade (6, 56-58). Foram desenvolvidas técnicas de PCR para a detecção de *S. mansoni* em amostras de fezes (57) e, mais recentemente ,foram desenvolvidas técnicas de *Multiplex Real-Time – PCR* (qPCR) para a deteção e quantificação de *S. mansoni* e *S. haematobium* (58). A técnica de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) – PCR embora

1. Introdução

não seja utilizada como ferramenta de diagnóstico pode ser utilizada para detectar diversidade genética não só entre parasitas de diferentes regiões geográficas e intra-regionais, mas também entre estirpes provenientes de diferentes hospedeiros intermediários ou definitivos, podendo ser uma mais valia em estudos epidemiológicos (59-63). Embora as técnicas de PCR tenham uma elevada especificidade e sensibilidade, são bastante dispendiosas e requerem material altamente especializado, sendo por isso pouco utilizados em programas de controlo em larga escala (6).

1.1.7. Tratamento e Controlo

O Praziquantel é o fármaco de eleição no tratamento da schistosomose devido à sua eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma* capazes de infectar seres humanos, à sua fácil administração e boa tolerabilidade (1, 18, 64-68). A sua descoberta marcou um ponto de viragem no controlo da schistosomose, mudando as prioridades do controlo da interrupção da transmissão pela aplicação de moluscidas, para a terapia em massa de populações em risco. (17, 18, 25, 65, 68-71).

A OMS recomenda a utilização de uma dose única de 40 mg/kg de PZQ para *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* e *S. intercalatum* e uma dose única de 60 mg/kg para *S. japonicum* e *S. mekongi*. Quando utilizado nas dosagens recomendadas, o PZQ, apresenta taxas de cura elevadas (75-85% para *S. haematobium*, 60-90% para *S. mansoni* e 60-80% para infecções mistas de *S. mansoni* e *S. haematobium*) (18, 72).

No Brasil a política nacional adotada para a luta contra a schistosomose recomenda uma dose de 60 mg/Kg para crianças com idade entre os dois e quinze anos e de 50 mg/kg para adolescentes e adultos. As políticas adotadas também desaprovam o tratamento sem diagnóstico, pelo que a quimioterapia preventiva já não é aplicada no país (17, 73).

1.1.8. Fármaco-resistência

O PZQ tem sido utilizado para tratamento em massa há mais de 30 anos em áreas endémicas da schistosomose. A possibilidade de emergência de resistência a este fármaco

1. Introdução

tem sido motivo preocupação por parte das autoridades a nível mundial (2, 17, 19, 29, 64, 65, 68, 74).

Alguns trabalhos mostraram ser possível desenvolver estirpes resistentes à dose terapêutica de PZQ por pressão seletiva com doses sub-terapêuticas de fármaco ao longo de algumas gerações (64, 68, 74-77).

Actualmente existem alguns casos reportados de resistência do *S. mansoni* ao PZQ no campo, nomeadamente em países como Egipto e Senegal (18, 19, 43, 64, 65, 74, 76, 78-81). Embora não existam evidências directas de resistência da espécie *S. haematobium* ao PZQ, têm sido referidos casos de falha de eliminação da infecção após tratamentos repetidos (43, 82-86).

Uma vez que se desconhecem os mecanismos exactos de acção do PZQ, também os mecanismos de resistência de *Schistosoma* a este fármaco ainda não são conhecidos (2, 19, 68). Liang *et al.* (87) demonstrou que um isolado de cercárias machos de *S. mansoni* susceptível ao PZQ tinha maior taxa de perda de cauda do que um isolado de cercárias fêmeas, resultado que não observou quando utilizou um isolado de cercárias de uma estirpe resistente, sugerindo que o fenómeno de resistência ao PZQ é induzido pela diminuição da susceptibilidade do macho.

A OMS não reconhece a existência de uma população de *Schistosoma* resistente estabelecida numa região endémica, no entanto recomenda uma vigilância activa para a sua eventual emergência (17, 19, 22, 68, 88).

1.2.Bombas de Efluxo

Os transportadores membranares ABC (*ATP-binding cassette*) constituem uma família de proteínas conservadas existentes em diversos organismos, desde as bactérias aos humanos. São proteínas integrais de membrana que transportam activamente diversos substratos através da dupla camada lipídica das células e que estão envolvidas em diversos processos celulares. Uma das suas características mais notáveis é que o movimento de

1. Introdução

moléculas, acoplado à hidrólise de ATP, pode ser para o exterior da célula (secreção) ou para o interior da célula (importação) (89-92).

Nas bactérias os transportadores ABC podem mediar a absorção essencial de nutrientes ou podem exportar substratos, incluindo fármacos e antibióticos. No sistema dos procariotas a existência de transportadores ABC é crucial para a absorção de pequenos solutos como a histidina, a maltose, péptidos ou ribose, no entanto, a maioria dos transportadores encontrados nos fungos e parasitas funcionam quase exclusivamente como exportadores, mediando a translocação de substratos do citosol para o exterior da célula ou para organelos intracelulares. É de notar que alguns transportadores ABC encontrados nas bactérias, fungos e parasitas, estão envolvidos na fármaco-resistência (90-92).

Mais de 100 transportadores ABC foram descritos até hoje em organismos desde os humanos até às bactérias, no entanto a função de muitas destas proteínas permanece um mistério (90, 92).

A maioria do nosso conhecimento dos transportadores ABC deriva de estudos da glicoproteína-P (P-gp) de mamíferos, uma glicoproteína transmembranar pertencente ao grupo de proteínas associadas à multirresistência aos fármacos (*Multidrug Resistant* – MDR), uma bomba de catiões que é produto do gene *ABCB1* (anteriormente conhecido como gene *MDR1*) com um peso molecular de cerca de 170 kDa (91, 93-97). Foi descoberta nos anos 1970 em células dos ovários de hamsters seleccionadas para a resistência à colchicina, como um fenómeno de multirresistência a fármacos (MDR) e células tumorais (89, 94, 98-102). A comparação do perfil hidropático das P-gp dos mamíferos com uma família multifuncional de transportadores de bactérias mostrou que ambos os tipos partilham uma extensa região transmembranar idêntica à encontrada em proteínas de formação de poros na membrana plasmática. A comparação também revelou que os terminais C contêm sequências homólogas aos domínios de ligação nucleotídicos das proteínas de ligação de ATP. Estes dados permitiram reconhecer as P-gp como um homólogo eucariótico da família de transportadores multifuncionais das bactérias, mais tarde conhecidos como a superfamília ABC (89, 93, 95, 96, 103). A proximidade das P-gp com a proteína transportadora hemolisina B apoia um modelo funcional para as P-gp

1. Introdução

como bomba de efluxo que transporta uma grande variedade de substratos (89, 92, 93, 96, 97, 99, 104).

Existem diversos modelos para o mecanismo de transporte de fármacos mediado pelas P-gp. O modelo das flipases sugere que as P-gp retiram compostos citotóxicos hidrofóbicos do interior da célula para o exterior através da bicamada fosfolipídica onde os agentes se podem difundir (89, 99, 100). Alternativamente é sugerido que as P-gp actuam como uma flipase fosfolipídica, alterando a permeabilidade da membrana e assim diminuindo a concentração de fármaco. É também sugerido que células que expressem *MDR1* tenham compartimentos intracelulares que têm menor pH do que células que não expressem P-gp e alteração da distribuição intracelular de fármaco ou alterações na permeabilidade da membrana resultando na diminuição do influxo de fármaco (89, 96, 99, 100).

Embora a função fisiológica das P-gp ainda não esteja bem definida, sabe-se que estas estão associadas à resistência a múltiplos fármacos (MDRs) em vários organismos, desde as bactérias, aos fungos, parasitas e humanos, estando também associados a falhas de quimioterapia em diversos tipos de cancro (103, 105).

O Verapamil, um bloqueador de canais de cálcio, inibe o fluxo de fármaco activo e reverte a MDR nas células (90, 94, 98, 99, 104, 106) e tem sido descrito como um bom inibidor das P-gp bloqueando a hidrólise de ATP e o transporte da vimblastina em vesículas de células MDRs (94, 96, 98, 106). Também tem sido utilizado em diversos estudos de fármaco-resistência, incluindo a sua aplicação em quimioterapia contra diversos tipos de cancro (94, 99, 104).

1.2.1. Bombas de efluxo e os Helminthas

Na medicina veterinária, os padrões de eficácia dos anti-helmínticos exigem que pelo menos 95% da carga parasitária de nemátodes seja eliminada após administração de uma única dose de tratamento, sendo considerado resistente quando apresentado uma eficácia abaixo de 90%. Actualmente os anti-helmínticos utilizados muitas vezes não atingem esta eficácia contra as parasitoses humanas, sendo mais difícil saber se a falha de tratamento se deve a resistência. No entanto níveis de resistência elevados têm sido referidos em

1. Introdução

parasitas de animais, principalmente em nemátodes gastrointestinais de ruminantes e cavalos (107-109). Nas parasitoses humanas têm sido reportados casos de resistência ao Praziquantel no tratamento de *S. mansoni*, e mais recentemente casos de resistência a Ivermectina e lactonas macrocíclicas em *Oncocerca volvulus* e *Dirofilaria immitis* (110-112). Têm também sido descritos casos de resistência ao Triclabendazole em *Fasciola hepatica* em todo o mundo (109, 113-115). Nos últimos 40 anos têm sido desenvolvidas novas classes de anti-helmínticos, como Monepantel, Derquantel e Emodepside, no entanto estes não têm um grande espectro de acção contra parasitas, não tendo a sua utilização sido desenvolvida para humanos. Mesmo com o desenvolvimento de novos anti-helmínticos, o risco de aparecimento rápido de resistência não deve ser subestimado, já tendo sido possível demonstrar experimentalmente a resistência ao Monepantel em *Haemonchus contortus*.(107, 114, 116-118)

É fundamental compreender os mecanismos e a genética da resistência aos anti-helmínticos. Estes conhecimentos são necessários para o desenvolvimento de novos fármacos anti-helmínticos, de forma a reduzir a selecção de resistência e manter a sua eficácia, para monitorizar a dispersão da resistência utilizando marcadores sensíveis e específicos, para combinar anti-helmínticos que não partilhem mecanismos de resistência, ou para reverter a resistência ou explorar as alterações genéticas nela envolvidas (108, 114, 117, 119).

Mecanismos como a sobre expressão de transportadores MDR podem modular a resistência a diversos anti-helmínticos. Estes transportadores estão envolvidos em mecanismos não específicos, que podem levar à resistência cruzada pela modulação da concentração de fármaco nos seus alvos, comprometendo a sua eficácia. A resistência cruzada ocorre quando o mecanismo de resistência a diversos fármacos é o mesmo, envolvendo mutações genéticas idênticas (112-114). Este tipo de resistência ocorre pela exposição directa a um fármaco podendo gerar resistência a um ou mais fármacos aos quais o parasita não esteve exposto. Estes mecanismos normalmente envolvem níveis alterados de enzimas implicadas no metabolismo dos fármacos ou envolvem mecanismos de transporte que modulam a concentração de fármaco que chega ao alvo terapêutico (108, 113, 114). Mecanismos que alteram a concentração de fármaco são considerados mecanismos não específicos por poderem afectar fármacos de classes diferentes. Um dos

1. Introdução

mecanismos mais comum envolve níveis de expressão de RNA de transportadores ABC alterados, transportadores como as P-gps (112-114).

Em contraste com os mamíferos que têm pouca variedade de transportadores MDR, os nemátodes têm diversos genes homólogos para o gene humano *ABCB1* e *ABCC* (codificam os MRPs). A razão para esta diversidade não é conhecida, no entanto tem sido sugerido que estes são essenciais para proteger diferentes neurónios no corpo dos nemátodes de um largo espectro de toxinas (112, 113, 120).

Foram identificados 60 genes de transportadores ABC no genoma de *Caenorhabditis elegans*, no entanto muitos destes estão envolvidos no transporte de metabolitos endógenos (111, 121). Nem todos os genes de transportadores ABC estão expressos em todos os estados de desenvolvimento de *C. elegans* e, nos adultos, as proteínas transportadoras ABC são expressas em células excretoras, nos intestinos, anfidios, neurónios, músculos faringe, espermateca e vulva. Foram identificados 14 genes codificantes das P-gp no genoma de *C. elegans*. O papel das P-gp1 e P-gp3 em *C. elegans* tem sido explorado, sendo sugerido que as P-gp1 estejam envolvidas na sensibilidade aos iões de metais pesados como o arsenito e cádmio e as P-gp3 estarão envolvidas na sensibilidade à Cloroquina e Colchicina. Noutros estudos, foi demonstrado que a exposição ao Verapamil ou ao Valspodar (inibidores de P-gp) restaurou a sensibilidade à Ivermectina numa estirpe resistente. Estes dados sugerem que diferentes P-gps estão envolvidas na protecção dos nemátodes, dependendo da toxina, e que vários transportadores podem actuar em conjunto para garantir a protecção do verme (107, 112, 121).

A análise do genoma dos parasitas tem permitido a descoberta de P-gps; em *Brugia malayi* foram encontrados oito P-gps e em *H. contortus* conhecem-se as sequências totais ou parciais de nove P-gps e em *O. volvulus* foram descritas quatro P-gps (107, 116, 118). No entanto, o número de genes de P-gps identificados nos nemátodes parasitas é inferior aos identificados em *C. elegans*, facto que se ao genoma da maioria dos nemátodes parasitas ainda estar por identificar. (107, 112, 121).

1. Introdução

1.2.2. Bombas de efluxo e o *Schistosoma*

Os parasitas adultos de *Schistosoma* vivem nos vasos sanguíneos onde recolhem nutrientes e eliminam metabolitos tóxicos. A exportação de biomoléculas, incluindo metabolitos, é normalmente executada por transportadores ABC. Em *Schistosoma* as P-gp são o produto do gene *SMDR2*, um homólogo do gene *ABCB1* dos mamíferos (27, 122, 123). Em alguns trabalhos quantificou-se o RNA de *SMDR2* e o RNA do *SMRPI*. Foi demonstrado que os níveis de RNA *SMDR2* eram superiores nas fêmeas em relação aos machos, no entanto os níveis de proteína P-gp eram superiores nos machos em relação às fêmeas. Em contraste os níveis de RNA *SMRPI* são expressos em níveis mais elevados nos machos do que nas fêmeas e são expressos em localizações diferentes; nos machos localizam-se predominantemente nos testículos e epitélio do intestino e nas fêmeas no poro excretor e regiões sub-tegumentares (1, 27, 123, 124).

Foi ainda demonstrado um aumento de RNA *SMDR2* na presença de PZQ sugerindo que a redução de sensibilidade ao PZQ estará associada às P-gp. Noutros trabalhos, extratos de estirpes com susceptibilidade reduzida ao PZQ mostraram ter níveis de RNA *SMDR2* e de proteína mais elevados. Estas observações sugerem uma possível associação entre o modo de acção do PZQ, a susceptibilidade e os transportadores MDR (1, 27, 123, 124).

Ao contrário das P-gp de mamíferos, para os quais o PZQ não é um substrato, o *SMDR2* parece ser capaz de transportar PZQ, contribuindo assim para a ligação entre a regulação de transportadores MDR em *Schistosoma* e a exposição ao PZQ assim como a um modelo de redução de susceptibilidade ao PZQ mediada por MDRs (27, 122, 124). O alvo molecular do PZQ continua por definir, embora seja sugerido que haja um envolvimento de um subtipo de canais de cálcio de subunidades β , encontrados apenas nos platelmintos. Outro possível alvo do PZQ inclui as proteínas membranares e intracelulares. É sugerido, então que o *SMDR2* (e possivelmente outros transportadores) estará envolvido na excreção do PZQ das células do parasita *Schistosoma*, reduzindo a sua contracção intracelular. O *SMDR2* pode inclusivé estar a impedir o PZQ de atravessar a membrana da célula, transportando-o para fora da camada bilipídica antes de ter a oportunidade de entrar na célula. Níveis aumentados de *SMDR2* podem assim prevenir a interacção do PZQ com os seus alvos, atenuando os efeitos letais do fármaco (27, 123, 124).

1. Introdução

1.3. Objectivo

Considerando o envolvimento das bombas de efluxo P-gp na fármaco-resistência noutros helmintas, assim como o aumento da expressão do gene *SMDR2* em parasitas de *Schistosoma* spp resistentes, ou na presença de fármaco, o objectivo geral deste trabalho, será avaliar o envolvimento das bombas de efluxo P-gp na fármaco-resistência ao PZQ em *Schistosoma mansoni*. Para podermos atingir este objectivo foram traçados os seguintes objectivos específicos:

- Selecionar uma estirpe de *S. mansoni* resistente ao PZQ;
- Confirmar a existência de polimorfismos genéticos, na estirpe resistente seleccionada, que possam estar associados à resistência ao PZQ;
- Avaliar a actividade das bombas de efluxo P-gp nos parasitas da estirpe sensível e resistente;
- Avaliar a susceptibilidade dos parasitas da estirpe sensível e resistente ao PZQ na presença e ausência de Verapamil;
- Avaliar a expressão do gene *SmMDR2* entre parasitas da estirpe sensível e resistente na presença e ausência de fármaco.

1. Introdução

2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1.Obtenção da estirpe resistente

2.1.1. Modelo Animal

A estirpe foi desenvolvida em murganhos machos, *Mus musculus* da estirpe *CD1* com aproximadamente oito semanas de idade na altura da infecção. O murganho é considerado o modelo animal de escolha para a Schistosomose, por ser um bom hospedeiro do parasita e reproduzir de forma semelhante a patologia da infecção humana por *Schistosoma mansoni*, além de ser um modelo fácil de criar e manipular (17).

Os murganhos, com cerca de 20 gramas foram adquiridos no biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, no qual foram mantidos em condições de temperatura ($21\pm1^{\circ}\text{C}$), humidade (45-55 %) e luminosidade (ciclos de 12h de luz/escuridão) adequados.

Foram infectados de forma natural, expondo a respectiva cauda a cerca de 100 cercárias de *S. mansoni* que, por penetração natural (transdérmica) das mesmas, dão origem à infecção.

2.1.2. Parasitas

Os parasitas utilizados pertencem a uma estirpe de laboratório de *S. mansoni* de Belo Horizonte (BH) sensível ao PZQ, sendo o seu ciclo de vida mantido pelo Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas da UEIPM, IHMT, sendo os moluscos da espécie *B. glabrata* utilizados como hospedeiro intermediário.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária, UTL (Ref. 0421/2013), os animais foram mantidos e manipulados de acordo com a legislação nacional e Europeia (DL 276/2001 e DL 314/2003; 2010/63/UE adopted on 22 September 2010), no que respeita à protecção e bem-estar animal

2. Material e Métodos

2.1.3. Seleção do fenótipo de resistência ao Praziquantel

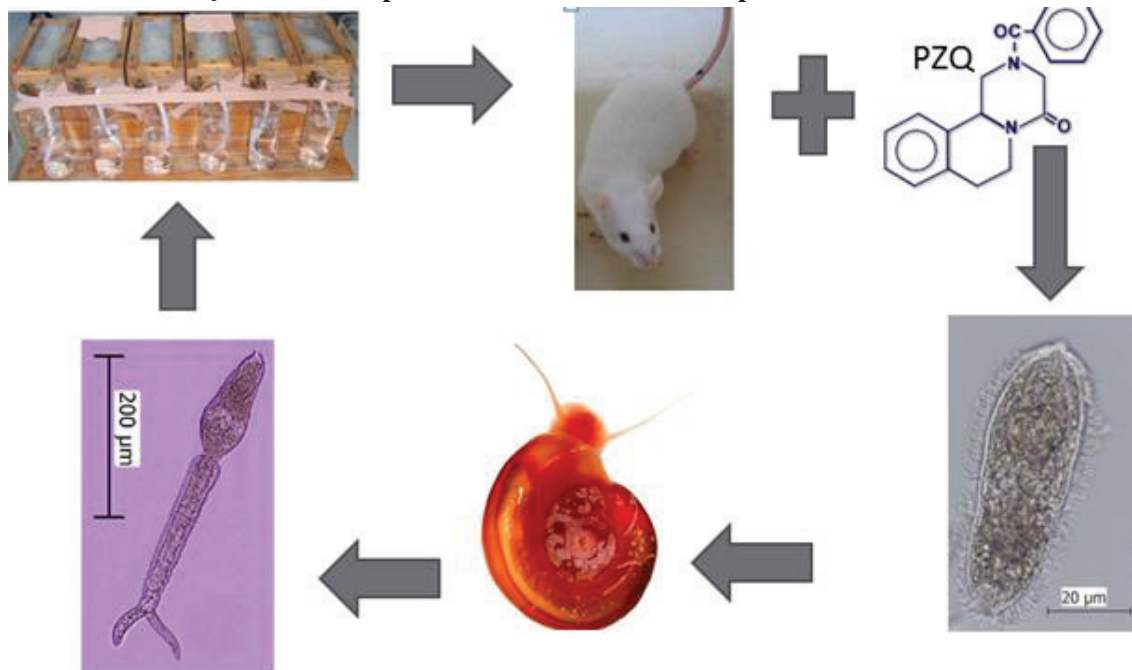


Figura 4 – Seleção da estirpe de *S. mansoni* fármaco-resistente ao PZQ, por tratamento de murganhos infectados com doses subterapêuticas ao longo de várias passagens do ciclo de vida

Os murganhos infectados com a estirpe BH foram submetidos a uma dose subterapêutica de fármaco sendo, ao final de 15 dias, a continuação de eliminação de ovos viáveis confirmada pela técnica coprológica Telemann-Lima. Os murganhos foram abatidos e os ovos presentes no fígado foram utilizados para a infecção de caracóis da espécie *B. glabrata*. Após estes eliminarem cercárias (30 a 60 dias após infecção), as mesmas foram utilizadas para infectar murganhos CD1 e o procedimento anterior foi repetido. A dosagem de PZQ foi aumentada a cada duas passagens como demonstrado na Figura 5.

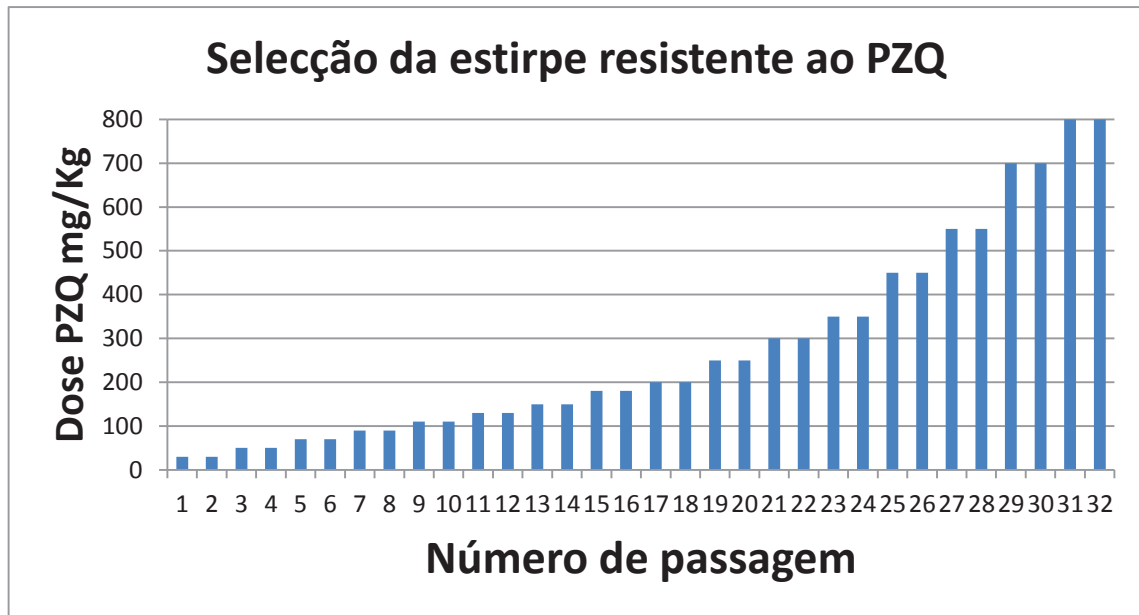


Figura 5 – Dosagem de PZQ por passagem, na selecção da estirpe resistente

Um estudo realizado por Cioli *et al.* (134) demonstrou que no modelo murino se pode definir uma estirpe de *S. mansoni* como resistente se esta tiver uma DL50 superior a 100 mg/kg. Actualmente a nossa estirpe resistente mostrou resistência a uma dosagem até 800 mg de PZQ/kg.

2.1.4. Método de Telemann-Lima

Emulsionou-se em cerca de 20 cm³ de água, 0,4–0,5 g de fezes dos murganhos. A emulsão obtida foi coada através de duas gases sobrepostas para um tubo de centrífuga. Ao filtrado juntou-se um volume de éter numa proporção de 1:2. Os tubos foram centrifugados a 5000 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi colocado numa lâmina e observado ao microscópio óptico (125).

2.2.RAPD-PCR

2.2.1. Extracção de DNA

Para a extracção do DNA, os parasitas foram separados por sexo, em grupos de 2 no caso dos machos e de 4 no caso das fêmeas. Procedeu-se à extracção de DNA tanto da estirpe

2. Material e Métodos

resistente (ER) como da estirpe normal (sensível a PZQ) (ES), utilizando o protocolo CTAB modificado (126). Os parasitas foram macerados em tubos de microcentrífuga com 600 µL de tampão de extração CTAB (133.2 mM Tris, 1.87 M de NaCl, 27.37 mM de EDTA 73.2 mM de CTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamónio) pré aquecido a 55 °C e com 10 µL Proteinase K (10 mg/mL) para desproteínização. Os tubos foram incubados a 55 °C durante 90 minutos com agitação frequente. Após a incubação foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturado por inversão durante 2 minutos sendo de seguida submetido a uma centrifugação rápida para separação da fase orgânica da fase aquosa. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo que continha 800 µL de etanol absoluto gelado para precipitar o DNA. As amostras foram centrifugadas a 8,000 g durante 20 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol a 70% e centrifugado a 8,000 g durante 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco e dissolvido em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH=8). O DNA extraído foi guardado a -20 °C até utilização.

2.2.2. Condições de PCR

A análise molecular foi feita por RAPD-PCR. Foram seleccionados 10 *primers* (Tabela 1), com sequências de 10 nucleótidos (Eurofins MWG Operon) uma vez que estes tinham mostrado ser úteis na detecção de polimorfismos entre espécies de *S. mansoni* (127). As reacções de amplificação foram realizadas utilizando GoTaq® Flexi DNA Polymerase, onde, por cada reacção de amplificação foram adicionados 10 µL de 5x Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 0,2 mM de nucleotidos (cada), 10 pmol de *primer*, 2,5 U de Gotaq® DNA Polymerase e 10 µg de DNA para um volume final de 25 µL. A amplificação foi a seguinte: um passo inicial de desnaturação de 92 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos cada com desnaturação a 92 °C durante 1 minuto, emparelhamento a 34 °C durante 4 minutos e fase de alongamento a 72 °C durante 2 minutos, após os ciclos realizou-se uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. A electroforese foi realizada em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio (EtBr). Todas as amostras amplificadas com o mesmo *primer* foram incluídas no mesmo gel.

2. Material e Métodos

Tabela 1 – Sequência de *primers* utilizados para RAPD-PCR

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
OPI-3	5'- CAGAAGCCCA - 3'
OPI-5	5' – TGTTCACGG - 3'
OPI-6	5' – AAGGCGGCAG - 3'
OPI-7	5' – CAGCGACAAG - 3'
OPI-8	5' – TTTGCCCGGT - 3'
OPI-9	5' – TGGAGAGCAG - 3'
OPI-12	5' – AGAGGGCACA - 3'
OPI-16	5' – TCTCCGCCCT - 3'
OPI-17	5' – GGTGGTGATG - 3'
OPI-18	5' – TGCCCAGCCT - 3'

2.2.3. Análise de perfis electroforéticos

Uma vez observadas as diferenças polimórficas entre parasitas sensíveis e resistentes, calculou-se o coeficiente de similaridade (S) (*Dice's coefficient*) (128, 129) de acordo com a fórmula:

$$S = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Onde *a* corresponde ao número de bandas partilhadas por ambas as estirpes, *b* corresponde ao número de bandas presentes na estirpe susceptível e ausentes na estirpe resistente e *c* corresponde ao número de bandas presentes na estirpe resistente e ausentes na estirpe susceptível.

2.3. Ensaio de acumulação de Brometo de Etídio

Realizou-se um ensaio para comparar a expressão de P-gps entre a estirpe sensível e resistente. Para este efeito utilizou-se um ensaio de acumulação de Brometo de Etídio na presença de Verapamil (inibidor de P-gps). Após a perfusão mantiveram-se os parasitas em soro fisiológico. Os parasitas foram expostos ao inibidor durante uma hora. Ao fim deste tempo foi adicionado Brometo de Etídio (0,25 µg/mL) e observaram-se os parasitas sob microscopia de fluorescência e fotografados de dois em dois minutos durante 20

2. Material e Métodos

minutos. Após 20 minutos adicionou-se 1 mM de cloreto de cálcio para reverter o efeito do inibidor, tendo sido de novo fotografados durante 16 minutos em *timepoints* de 2 minutos. Foram utilizados três grupos controle, um grupo sem inibidor, um grupo sem Brometo de Etídio e um grupo sem inibidor e sem Brometo de Etídio. A fluorescência das fotos foi quantificada utilizando o programa ImageJ (imagej.nih.gov) e comparada entre os diferentes grupos.

Foram feitas 5 repetições para cada grupo e foi utilizada a média para a construção dos gráficos.

2.4. Ensaio de susceptibilidade ao PZQ *in vitro*

Realizou-se um ensaio *in vitro* para avaliar a susceptibilidade dos parasitas adultos de ambas as estirpes ao PZQ na presença e ausência de Verapamil, com o intuito de verificar o envolvimento das bombas de efluxo no fenótipo da resistência ao PZQ. Os parasitas foram recolhidos por perfusão do fígado com soro fisiológico e separados por sexo. Prepararam-se placas de cultura com 24 poços com 1 mL de meio de cultura RPMI (RPMI-1640 (Sigma), 200 mM L-glutamina (Sigma), 10 mM HEPES (Sigma), 24 mM de NaHCO₃ (Sigma), 10000 UI de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma), pH 7) suplementado com 15% de soro fetal bovino e adicionaram-se 3 parasitas por poço. Os parasitas foram mantidos na estufa *overnight* a 37° C numa atmosfera com 5% de CO₂, com o intuito de recuperarem do *stress* da perfusão. Após este período foram adicionadas diversas concentrações de PZQ e de Verapamil (tabela 2) e mantidos na estufa durante 24h, após as quais o meio foi substituído por meio sem fármaco e mantido durante mais 48h. Os parasitas foram observados a cada 24h e o meio de cultura foi mudado com a mesma periodicidade. Foram considerados mortos parasitas que não apresentassem qualquer movimento quando observados ao microscópio durante um período de 2 minutos. As doses letais foram calculadas através do programa SPSS-20[®] para Windows utilizando o modelo de regressão Probit para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). As doses letais obtidas foram utilizadas para a construção de gráficos.

2. Material e Métodos

Tabela 2 – Concentrações de Praziquantel (PZQ) e Verapamil utilizadas no ensaio de susceptibilidade ao PZQ *in vitro*

		Verapamil	Praziquantel
Estirpe Sensível	Machos	0 µg/mL	0 a 8 µg/mL
		0,1 µg/mL	0 a 8 µg/mL
		0,5 µg/mL	0 a 8 µg/mL
	Fêmeas	0 µg/mL	0 a 90 µg/mL
		2 µg/mL	0 a 90 µg/mL
Estirpe Resistente	Machos	0 µg/mL	0 a 40 µg/mL
		0,5 µg/mL	0 a 20 µg/mL
		1 µg/mL	0 a 15 µg/mL
		2 µg/mL	0 a 15 µg/mL
		4 µg/mL	0 a 10 µg/mL
	Fêmeas	0 µg/mL	0 a 900 µg/mL
		4 µg/mL	0 a 900 µg/mL

2.5.Real-time-PCR

2.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído utilizando o protocolo do Trizol (Invitrogen) onde os vermes foram homogeneizados em tubos de eppendorf de 1.5 mL com 1 mL de Trizol. Após a homogeneização adicionaram-se 0.2 mL de clorofórmio e incubou-se durante 2 minutos à temperatura ambiente, seguido por uma centrifugação a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C, para a separação de fase. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e precipitou-se o RNA adicionando 0.5 ml de isopropanol seguido de uma centrifugação a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol a 75%. O tubo foi agitado em *vortex* e em seguida centrifugado durante 5 minutos a 7500 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi ressuscitado com 50 µL de água livre de RNase (RNase free water). Por fim, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro e guardado a -80 °C até o momento de sua utilização na síntese de DNA complementar (cDNA).

A síntese de cDNA foi feita com o kit qScriptTM cDNA Supermix (Quanta

2. Material e Métodos

BiosciencesTM), de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de síntese, utilizaram-se 2 µg de RNA total, foram acrescentados 4 µL de qScript cDNA Supermix, e RNase-free water (Promega) de forma a perfazer um volume de 20 µL. A reação foi incubada a 25 °C durante 5 minutos, seguida de uma incubação a 42 °C durante 30 minutos e por fim desnaturada a 85 °C durante 5 minutos. O cDNA sintetizado foi utilizado para qPCR.

2.5.2. Condições de qPCR

A expressão do gene *SMDR2* foi realizada utilizando a técnica de qPCR. O Real-time qPCR foi realizado utilizando Perfecta®SYBR® Green SuperMix for iQ (Quanta Biosciences) e o sistema de detecção iQTM Real-Time PCR Detection System (BioRad). O RNA ribossomal 18S de *S. mansoni* (*Sm18S*) foi utilizado como a sequência de referência nesta experiência. A reação de qPCR consistiu em 2.5 µL de cDNA previamente sintetizado, 12.5 µL de Perfecta®SYBR® Green SuperMix, 2.5 pmol de cada *primer* e água em quantidade suficiente para um volume final de 25 µL conforme recomendação do fabricante. A reação foi submetida a 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 53 °C por 20 segundos (60 °C *18S*) e 72 °C por 32 segundos. A análise dos dados gerados foi feita com o auxílio do programa iCycler (Biorad), tendo o cálculo do *threshold*, ou limiar de detecção, sido realizado por este meio. A eficiência de amplificação (E) de cada um dos pares de *primers* foi determinada por meio de uma curva padrão composta de cinco pontos e que foi gerada a partir de reações em triplicado e utilizando diluições seriadas de cDNA. Os *primers* utilizados para a amplificação do gene *MDR2* de *S. mansoni* (*SmMDR2*) e *Sm18S* encontram-se na tabela 3.

Os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (130) para determinar o rácio de expressão relativa entre o gene alvo (*SmMDR2*) e o gene de referência (*Sm18S*), com as calibrações e correções necessárias para a eficiência de amplificação.

2. Material e Métodos

Tabela 3 – Sequências dos primers utilizados para qPCR

Gene	Sequência	
<i>SmMDR2</i>	Foward	5'-TCTGACAATCGACCTGGTG-3'
	Reverse	5'-CCAAGGAAGCAATGACTAAAAC-3'
<i>Sm18S</i>	Foward	5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3'
	Reverse	5'ACCACCCACCGAATCAAGAAAG-3'

2. Material e Métodos

3. Resultados

3. Resultados

3. Resultados

3.1. RAPD-PCR

Dos 10 *primers* utilizados para o RAPD-PCR, dois (OPI-16 e OPI-17) não apresentaram qualquer padrão passível de comparação, tendo os restantes oito *primers* apresentado padrões de bandas comparáveis. Destes oito *primers* com padrões de bandas bem definidos, sete (OPI-3, OPI-5, OPI-6, OPI-8, OPI-9, OPI-12 e OPI-18) apresentaram diferenças polimórficas. Estes *primers* produziram um total de 54 fragmentos bem definidos (5 a 12 fragmentos, média de 8 fragmentos) entre 200 pb e 1200 pb. Do total de fragmentos gerados 23 foram polimórficos (43%), com o *primer* OPI-5 a gerar mais polimorfismos, seguido do *primer* OPI-6 (Tabela 4). A identificação de bandas polimórficas foi feita com base na comparação de padrões de bandas no mesmo gel para ambas as estirpes, sendo apenas consideradas polimórficas as bandas detectadas em todos os indivíduos da mesma estirpe.

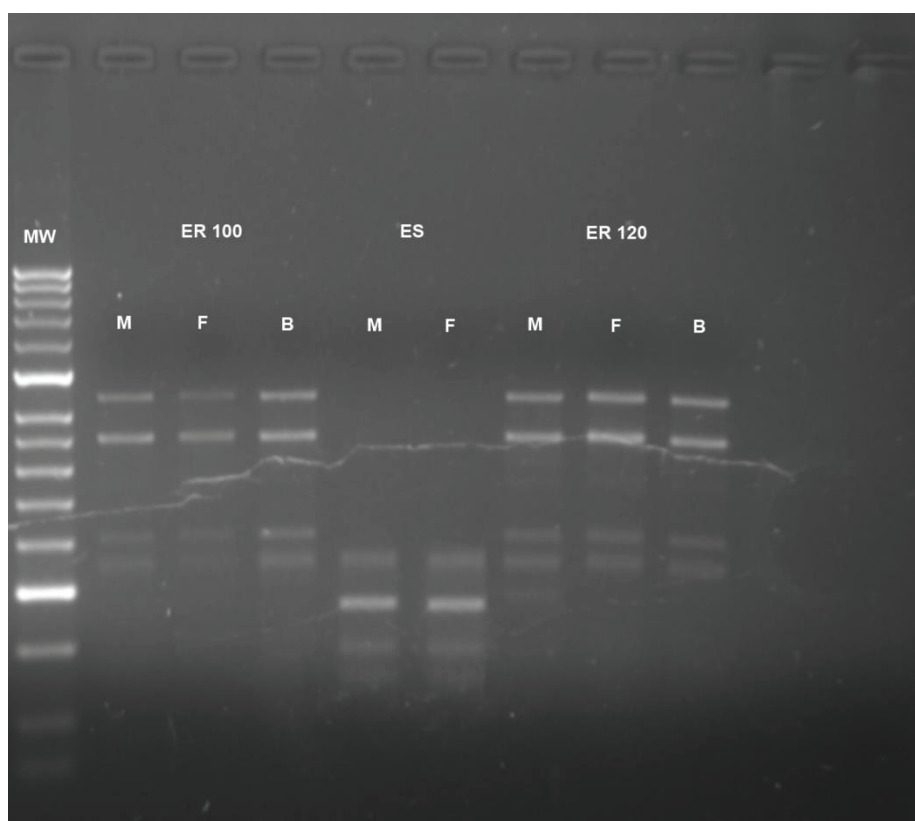


Figura 6 – RAPD-PCR, OPI-5. MW – marcador molecular 2000 bp; ER 100 - Estirpe resistente a 100 mg/kg de Praziquantel; ES - Estirpe sensível a PZQ; ER 120 - Estirpe resistente a 120 mg/kg de Praziquantel. M – Macho; F – Fêmea; B – Macho+Fêmea.

3. Resultados

Uma vez observadas as diferenças polimórficas entre parasitas sensíveis e resistentes, calculou-se o coeficiente de similaridade (*Dice's coefficient*) (Tabela 4). O *primer* OPI-5 foi o que obteve um coeficiente de similaridade mais baixo (0,25) apenas havendo partilha de uma banda entre ambas as estirpes e 3 bandas polimórficas para cada *primer*. O *primer* OPI-7 não apresentou diferenças polimórficas entre ambas as estirpes e o *primer* OPI-3 (de entre os *primers* que apresentaram diferenças polimórficas) foi o que teve coeficiente de similaridade mais elevado (0,83), com 5 bandas comuns para ambas as estirpes e duas bandas polimórficas apenas presentes na estirpe resistente.

Tabela 4 – Coeficiente de similaridade (S) de Dice

	OPI-3	OPI-5	OPI-6	OPI-7	OPI-8	OPI-9	OPI-12	OPI-18
Nº de bandas partilhadas	5	1	5	5	3	3	3	4
Nº de bandas presentes na ES e ausentes na ER	0	3	2	0	1	1	0	0
Nº de bandas presentes na ER e ausentes na ES	2	3	3	0	1	2	2	3
Coeficiente de similaridade (S)	0,83	0,25	0,67	1	0,75	0,67	0,75	0,73

3.2. Ensaio de acumulação de Brometo de Etídio

Para comparar a expressão de P-gps entre a estirpe sensível e resistente, a actividade de efluxo da estirpe *S. mansoni* resistente ao PZQ foi observada por microscopia de fluorescência e comparada com a estirpe sensível parental, sendo avaliada pela acumulação de Brometo de Etídio no parasita, acumulação esta que se traduz na intensidade de fluorescência. Como é possível observar na Figura 7 na estirpe sensível após exposição a 1 µg/mL de Verapamil o efluxo de Brometo de Etídio é inibido, havendo

3. Resultados

um grande aumento na fluorescência observada, sendo possível observar, após a exposição ao cloreto de cálcio, um decréscimo desta mesma fluorescência.

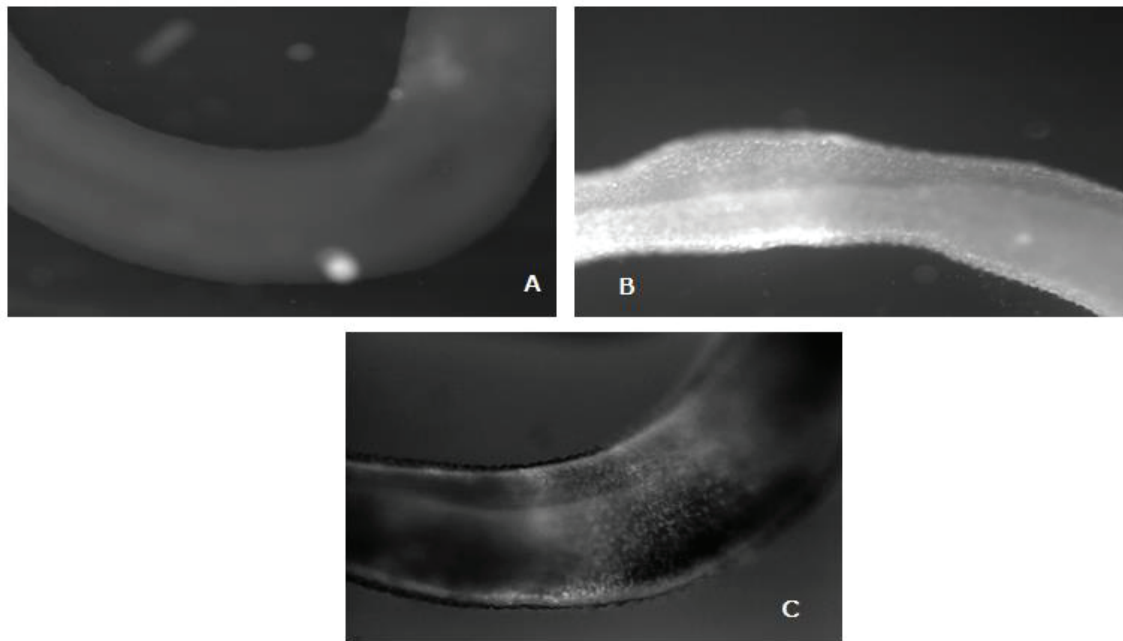


Figura 7 – Machos da estirpe sensível de *S. mansoni* A) expostos a 0,25 µg/mL de Brometo de Etídio; B) expostos a expostos a 1 µg/mL de Verapamil e a 0,25 µg/mL de Brometo de Etídio; C) expostos a expostos a 1 µg/mL de Verapamil, a 0,25 µg/mL de Brometo de Etídio e a 1 mM de CaCl₂

Na estirpe resistente, após a exposição a 1 µg/mL de Verapamil, não se observou uma acumulação significativa de Brometo de Etídio, não sendo, após a exposição a cloreto de cálcio, observado um decréscimo da fluorescência. Foi testada a acumulação de Brometo de Etídio na estirpe resistente após a exposição a uma concentração mais elevada de inibidor (2 µg/mL), após a qual já foi possível observar acumulação de Brometo de Etídio (Figura 8).

3. Resultados

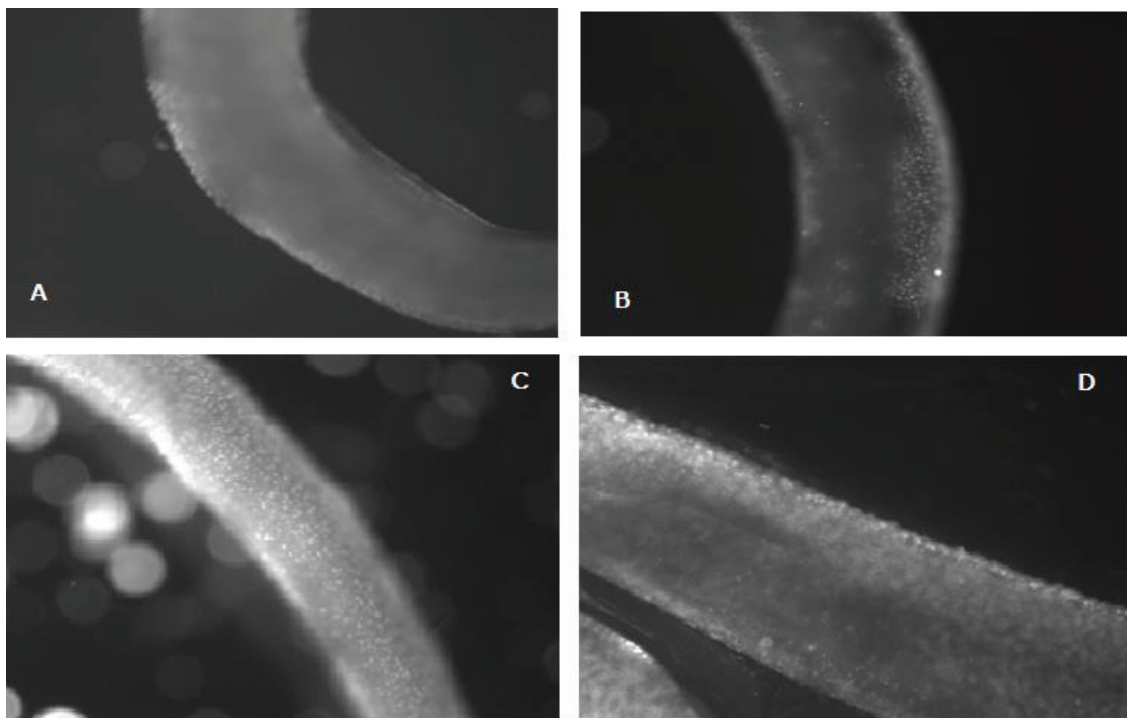


Figura 8 – Machos da estirpe resistente de *S. mansoni* A) expostos a 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio; B) expostos a expostos a 1 $\mu\text{g/mL}$ de Verapamil e a 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio; C) expostos a expostos a 2 $\mu\text{g/mL}$ de Verapamil e a 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio; D) expostos a expostos a 1 $\mu\text{g/mL}$ de Verapamil, a 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio e a 1 mM de CaCl_2

Ao longo das observações sob microscopia de fluorescência da acumulação de Brometo de Etídio na presença e ausência de inibidores em ambas as estirpes, foram tiradas fotos em *time-points* de 2 em 2 minutos. A fluorescência nas fotos foi quantificada e foram criados gráficos para comparação.

Na estirpe sensível, nos parasitas expostos a 1 $\mu\text{g/mL}$ de Verapamil, é possível observar um aumento contínuo da fluorescência ao longo do tempo, sendo este aumento maior entre os 12 e os 20 minutos, atingindo aproximadamente o dobro dos níveis de fluorescência em relação aos parasitas não expostos a inibidor, ao fim de 18 minutos (*T-student*, $p < 0.05$). Após a adição de 1 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2) é possível observar uma queda acentuada nos níveis de fluorescência, chegando a níveis próximos dos parasitas não expostos a inibidor ao fim de 15 minutos (Figura 9).

3. Resultados

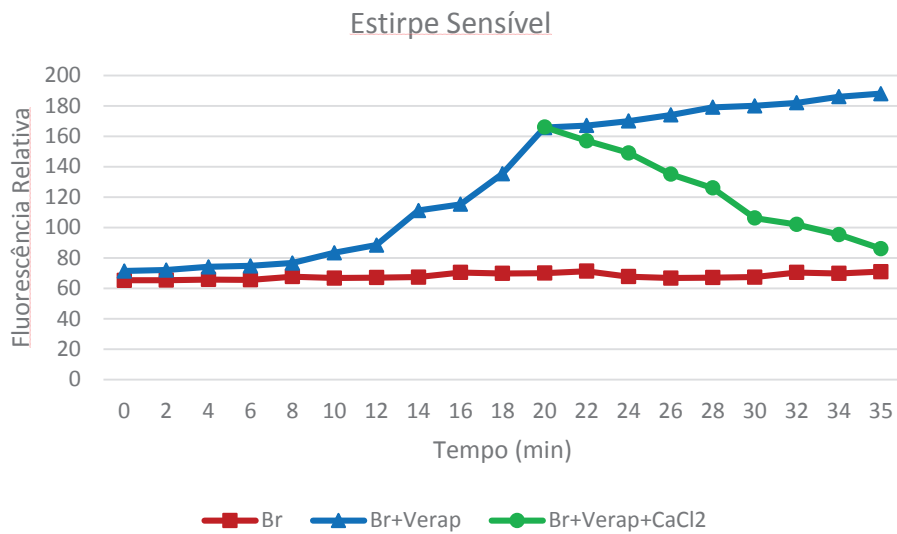


Figura 9 – Variação da acumulação de Brometo de Etídio (fluorescência), nos machos da estirpe sensível de *S. mansoni*, ao longo do tempo na presença e ausência de Verapamil e após a adição de CaCl_2 . Br) expostos a $0,25 \mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio; Br+Verap) expostos a expostos a $1 \mu\text{g/mL}$ de Verapamil e a $0,25 \mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio; Br+Verap+ CaCl_2) expostos a expostos a $1 \mu\text{g/mL}$ de Verapamil, a $0,25 \mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio e a 1 mM de CaCl_2

Na estirpe resistente, nos parasitas expostos a $1 \mu\text{g/mL}$ de Verapamil, foi possível observar um ligeiro aumento dos níveis iniciais de fluorescência, mantendo-se a fluorescência constante ao longo do tempo, não havendo uma redução da fluorescência após a adição de 1 mM de CaCl_2 (Figura 10). Nos parasitas expostos a $2 \mu\text{g/mL}$ é possível observar um aumento inicial da fluorescência mais significativo (*T-student*, $p < 0.05$), havendo um aumento pouco acentuado da fluorescência ao longo do tempo (Figura 10). Os parasitas da estirpe resistente, mesmo quando expostos ao dobro da concentração de inibidor de bombas de efluxo, tiveram níveis de fluorescência inferiores ao da estirpe sensível.

3. Resultados

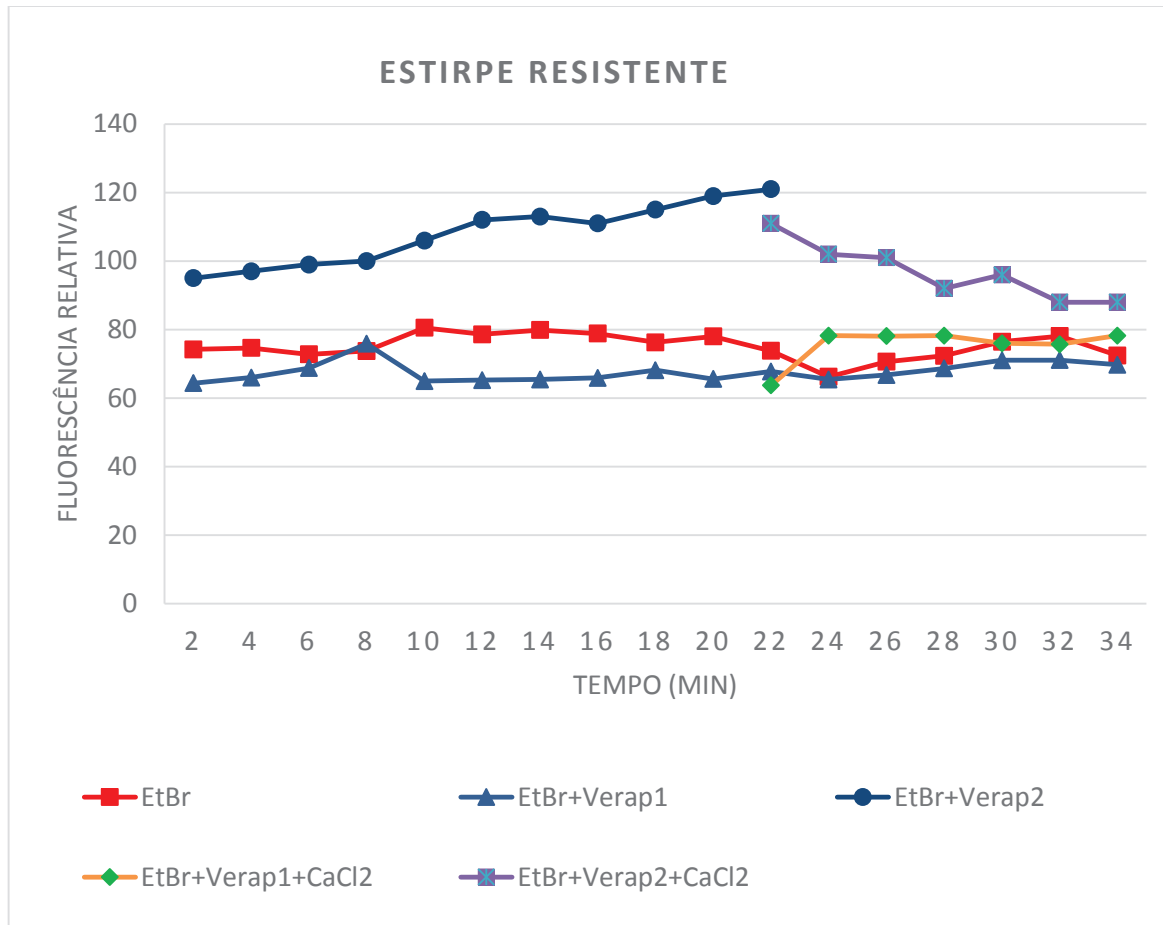


Figura 10 – Variação da acumulação de Brometo de Etídio (fluorescência), nos machos da estirpe resistente de *S. mansoni*, ao longo do tempo na presença e ausência de Verapamil e após a adição de CaCl_2 . EtBr) expostos a $0,25 \mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio; EtBr+Verap1) expostos a $1 \mu\text{g/mL}$ de Verapamil e a $0,25 \mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio; EtBr+Verap2) expostos a $2 \mu\text{g/mL}$ de Verapamil e a $0,25 \mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio; EtBr+Verap1+ CaCl_2) expostos a $1 \mu\text{g/mL}$ de Verapamil, a $0,25 \mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio e a 1 mM de CaCl_2 ; EtBr+Verap2+ CaCl_2) expostos a $1 \mu\text{g/mL}$ de Verapamil, a $0,25 \mu\text{g/mL}$ de Brometo de Etídio e a 1 mM de CaCl_2 .

3. Resultados

Tabela 5 – Média dos valores relativos de fluorescência e respectivo desvio padrão (SD), nos machos da estirpe sensível e resistente de *S. mansoni* após 20 minutos de exposição ao Brometo de Etídio, na presença e ausência de Verapamil. EtBr) expostos a 0,25 µg/mL de Brometo de Etídio; EtBr+Verap1) expostos a expostos a 1 µg/mL de Verapamil e a 0,25 µg/mL de Brometo de Etídio; EtBr+Verap2) expostos a expostos a 2 µg/mL de Verapamil e a 0,25 µg/mL de Brometo de Etídio

	Estirpe Sensível		Estirpe Resistente	
	Média	SD	Média	SD
EtBr	70	1,37	77	1,24
EtBr + Verap1	166	1,89	65,57	1,73
EtBr + Verap2	-	-	118	1,58

3.3. Ensaio de susceptibilidade ao PZQ *in vitro*

No ensaio *in vitro* avaliou-se a susceptibilidade dos parasitas adultos de ambas as estirpes ao PZQ na presença e ausência de Verapamil, com o intuito de verificar o envolvimento das bombas de efluxo na fármaco-resistência ao PZQ. Foram considerados mortos os parasitas que não apresentassem qualquer movimento quando observados ao microscópio durante um período de 2 minutos. Os dados foram analisados através do programa SPSS-20[®] para *Windows* utilizando o modelo de regressão *Probit* e as doses letais foram calculadas para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3.3.1. Machos Estirpe Sensível

Os machos da estirpe sensível na ausência de inibidor atingiram uma dose letal de 50% (DL50) quando expostos a 5,558 µg/mL, uma dose letal de 90% quando expostos a 7,548 µg/mL de PZQ e uma dose letal de 99% (DL99) quando expostos a 9,687 µg/mL de PZQ. Quando expostos a Verapamil, foi possível observar uma redução na quantidade de PZQ necessária para atingir as doses letais anteriormente mencionadas. Na presença de 0,1 µg/mL e de 0,5 µg/mL de Verapamil as DL50 foram de 4,728 e 3,896 as DL90 foram de 6,421 e 5,291 e as DL99 foram de 8,241 e 6,791, respectivamente (Tabela 6).

3. Resultados

Tabela 6 – Doses letais dos machos de *S. mansoni* da estirpe sensível em resposta ao PZQ na presença de diferentes concentrações de Verapamil

Concentração de Verapamil (µg/mL)	Mortalidade (%)						
	1	10	30	50	70	90	99
	Concentração de PZQ (µg/mL)						
0	3,188	4,092	4,903	5,558	6,299	7,548	9,687
0,1	2,712	3,481	4,171	4,728	5,359	6,421	8,241
0,5	2,235	2,869	3,437	3,896	4,416	5,291	6,791

Os valores das doses letais dos machos da estirpe sensível foram utilizados na construção dos gráficos (Figura 12) de forma a se ter uma melhor visualização do efeito do Verapamil na susceptibilidade ao PZQ, sendo possível visualizar, na sua presença uma diminuição da concentração de PZQ necessária para atingir os mesmos níveis de mortalidade, em comparação com os parasitas não expostos ao inibidor, sendo também é possível observar que a concentração de PZQ necessária diminui com uma maior concentração de Verapamil.

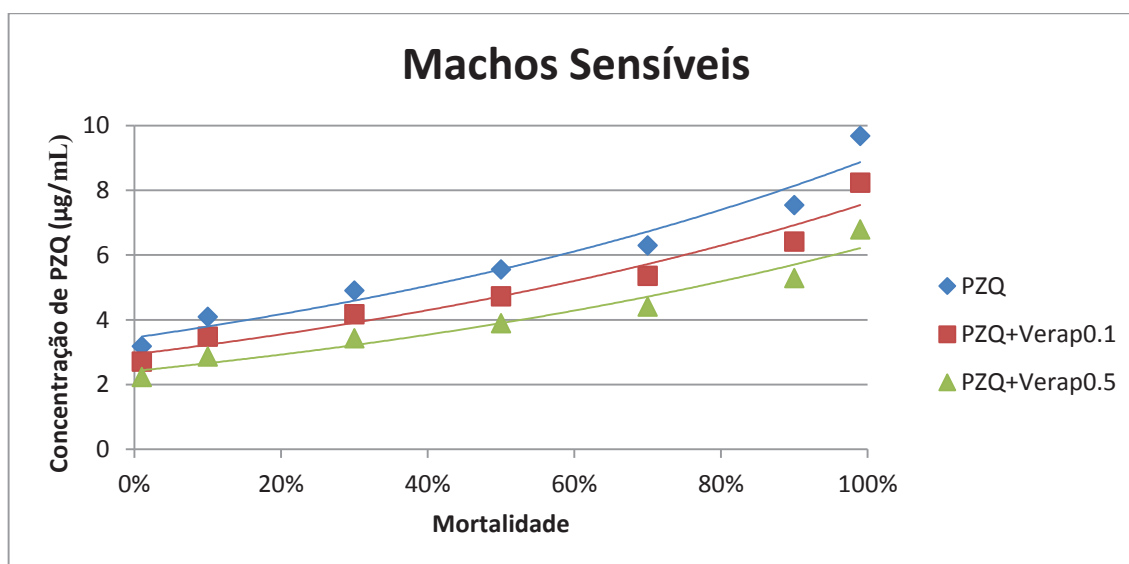


Figura 11 – Linha de tendência da mortalidade dos machos de *S. mansoni* da estirpe sensível com o aumento da concentração de PZQ na ausência e na presença de diferentes concentrações de Verapamil.

3. Resultados

3.3.2. Machos Estirpe Resistente

Os machos da estirpe resistente na ausência de inibidor atingiram uma DL50 quando expostos a 20,356 µg/mL, uma DL90 quando expostos a 30.658 µg/mL de PZQ e uma DL99 quando expostos a 42.809 µg/mL de PZQ. Quando expostos ao Verapamil, foi possível observar uma redução na quantidade de PZQ necessária para atingir as doses letais anteriormente mencionadas. Foi testado o efeito de 4 concentrações diferentes do inibidor na susceptibilidade ao PZQ, nomeadamente 0,5 µg/mL; 1 µg/mL; 2 µg/mL e 4 µg/mL. As DL50 foram de 10,596, 6,161, 1,603 e 1,126 as DL90 foram de 16,374, 11,702, 6,201 e 3,997 e as DL99 foram de 23,348, 19,743, 18,684 e 11,227, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 – Doses letais dos machos de *S. mansoni* da estirpe resistente em resposta ao PZQ na presença de diferentes concentrações de Verapamil

Concentração de Verapamil (µg/mL)	Mortalidade (%)						
	1	10	30	50	70	90	99
	Concentração de PZQ (µg/mL)						
0	9,679	13,516	17,215	20,356	24,069	30,658	42,809
0,5	4,809	6,857	8,867	10,596	12,661	16,374	23,348
1	1,923	3,244	4,738	6,161	8,01	11,702	19,743
2	0,138	0,414	0,921	1,603	2,788	6,201	18,684
4	0,113	0,317	0,671	1,126	1,891	3,997	11,227

Os valores das doses letais dos machos estirpe resistente foram utilizados na construção de gráficos (Figura 12) de forma a se ter uma melhor visualização do efeito do Verapamil na susceptibilidade ao PZQ, sendo possível visualizar, na presença de inibidor, uma diminuição da concentração de PZQ necessária para atingir os mesmos níveis de mortalidade, em comparação com os parasitas não expostos ao inibidor, sendo também possível observar uma diminuição da concentração de PZQ necessária quanto maior a

3. Resultados

concentração de Verapamil. Na presença de 0,5 µg/mL, a concentração mais baixa testada nesta estirpe, observou-se que as concentrações de PZQ letais são aproximadamente duas vezes inferiores às do grupo de parasitas não expostos a inibidor. É ainda possível observar, comparando com o gráfico da estirpe sensível, que a susceptibilidade ao PZQ na estirpe resistente na presença das restantes concentrações de Verapamil apresenta valores próximos, ou mesmo inferiores aos dos parasitas da estirpe sensível que não foram expostos a inibidor, para as respectivas doses letais.

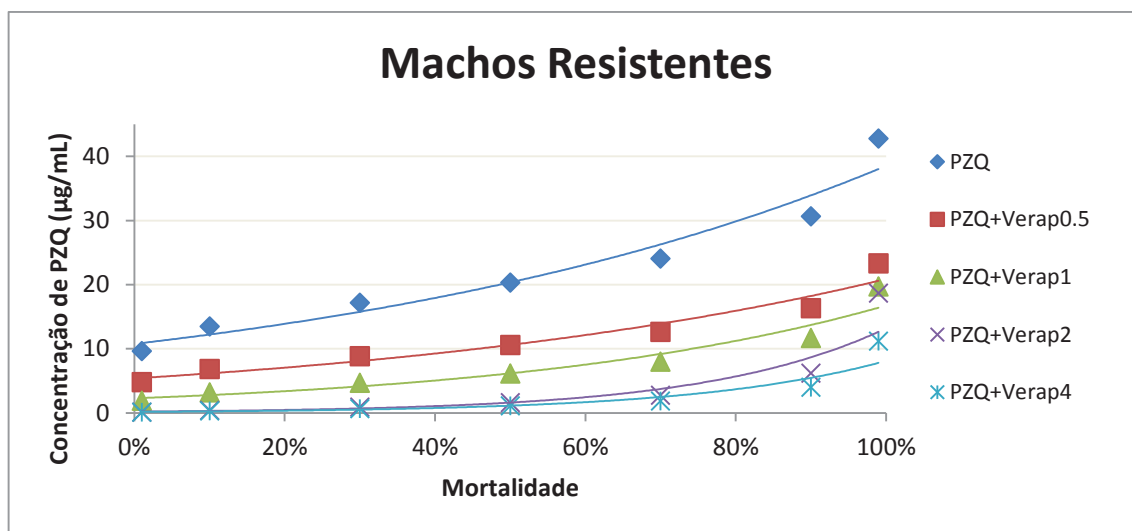


Figura 12 – Linha de tendência da mortalidade dos machos de *S. mansoni* da estirpe resistente com o aumento da concentração de PZQ na ausência de Verapamil e na presença de diferentes concentrações de Verapamil

3.3.3. Fêmeas Estirpe Sensível

As fêmeas da estirpe sensível na ausência de inibidor atingiram uma DL50 quando expostas a 64,047 µg/mL, uma DL90 quando expostas a 72,115 µg/mL de PZQ e uma DL99 quando expostas a 79,440 µg/mL de PZQ. Quando expostas a 2 µg/mL de Verapamil, não se observaram diferenças estatisticamente significativa na susceptibilidade ao PZQ, sendo as doses letais na presença do inibidor 63,967 µg/mL de PZQ para a DL50, 73,383 µg/mL de PZQ para a DL90, e 79,031 µg/mL de PZQ para a DL99 (Tabela 8). Através da representação gráfica (Figura 13) é possível observar que a susceptibilidade ao PZQ não sofre muitas alterações na presença de inibidor. Os

3. Resultados

resultados mostram ainda que as fêmeas da estirpe sensível são menos susceptíveis ao PZQ, que os machos de ambas as estirpes.

Tabela 8 – Doses letais das fêmeas de *S. mansoni* da estirpe sensível em resposta ao PZQ na presença de diferentes concentrações de Verapamil

Concentração de Verapamil ($\mu\text{g/mL}$)	Mortalidade (%)						
	1	10	30	50	70	90	99
	Concentração de PZQ ($\mu\text{g/mL}$)						
0	51,636	56,881	61,011	64,047	67,233	72,115	79,44
2	49,74	55,711	60,457	63,967	67,671	73,383	79,031

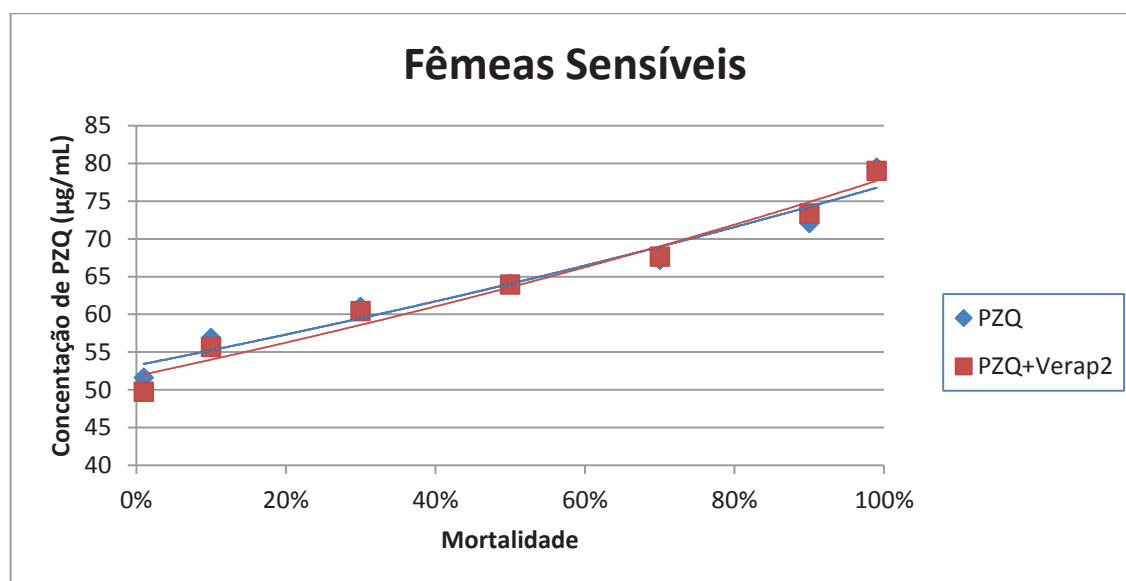


Figura 13 – Linha de tendência da mortalidade das fêmeas de *S. mansoni* da estirpe sensível com o aumento da concentração de PZQ na ausência e presença de Verapamil

3. Resultados

3.3.4. Fêmeas Estirpe Resistente

As fêmeas da estirpe resistente foram expostas a concentrações até 900 µg/mL de PZQ no entanto, dentro das concentrações testadas, não foi possível determinar as doses letais, tanto na ausência como na presença de Verapamil.

3.4.Real-time-PCR

A expressão do gene *SmMDR2* foi observada utilizando a técnica semi-quantitativa de qPCR. Os parasitas de cada estirpe foram separados por sexo e comparados entre si. Foram ainda comparados com parasitas expostos a 0,09 µg/mL de PZQ (durante 3 h) com parasitas não expostos ao fármaco (Figura 14). Quando comparados, os machos e as fêmeas da estirpe sensível, as fêmeas apresentaram um valor de *SmMDR2* aproximadamente 4 vezes mais elevado que os machos, no entanto quando expostos ao PZQ a expressão de *SmMDR2* nos machos aumentou 17 vezes em relação à expressão na ausência de PZQ, nas fêmeas, no entanto, não houve um aumento significativo de expressão. Os machos da estirpe resistente apresentaram, na ausência de fármaco, uma expressão de *SmMDR2* 32 vezes superior ao dos machos da estirpe sensível. Após a exposição ao PZQ os machos da estirpe resistente apresentaram uma expressão de *SmMDR2* aproximadamente 6 vezes superior à expressão do gene na ausência de fármaco. As fêmeas da estirpe resistente não tiveram alterações significativas na expressão de *SmMDR2* após a exposição ao PZQ, sendo a expressão aproximadamente 10 vezes inferior à das fêmeas da estirpe sensível.

3. Resultados

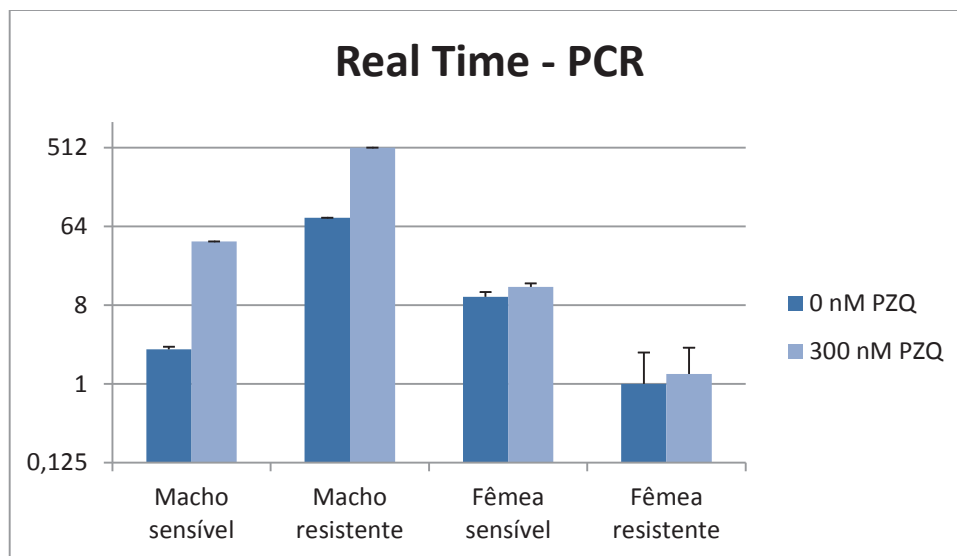


Figura 14 – Expressão semi-quantitativa do gene *SmMDR2* dos machos e fêmeas de ambas as estirpes na presença e ausência de PZQ

3. Resultados

4. Discussão e conclusão

4. Discussão e conclusão

4. Discussão e conclusão

A análise genética por *RAPD-PCR* foi desenvolvida de forma a estudar a variabilidade genética entre diferentes estirpes geográficas ou isolados de *Schistosoma* (61, 62, 131). Num estudo realizado por Tsai *et al.* (127) esta técnica identificou diferenças genéticas entre estirpes de *S. mansoni* de diferentes áreas geográficas que tinham sido referidas como sensíveis ou tolerantes ao Praziquantel (63). Para a realização deste estudo seleccionámos 10 dos 20 *primers* utilizados por Tsai *et al.* (127) verificando que esta metodologia não só é válida para estirpes de diferentes localizações geográficas, mas também para estirpes laboratoriais, sendo possível obter um padrão de bandas com diferenças polimórficas entre estirpes.

Dos 10 *primers* testados, 7 (sete) deram um padrão polimórfico específico para cada estirpe. No trabalho realizado por Tsai *et al.* (127) os 10 *primers* demonstraram um bom nível de amplificação, sendo úteis para estudos de diversidade genética de *S. mansoni* de murganhos com diferente *background* genético e imunológico. Com este estudo verificámos que sete destes *primers* também são úteis para distinguir estirpes com diferente sensibilidade ao PZQ (61-63).

Dos *primers* utilizados, o OPI-5 mostrou ser aquele que melhor diferencia a estirpe sensível da resistente, seguindo-se os *primers* Opi-6 e OPI-9. Estes resultados levam-nos a sugerir que estes três *primers* poderão ser bons marcadores para estudos de populações de *S. mansoni* laboratoriais ou de campo.

Era esperado que os valores do coeficiente de similaridade estivessem próximos de 1, pois a estirpe ER é uma estirpe que deriva da estirpe sensível, com a qual foi comparada, sendo por isso esperado que o perfil de ambas fosse muito próximo (128, 129). Surpreendente, para sete dos oito *primers* com perfil de bandas, o coeficiente de similaridade variou entre 0,87 e 0,25 (Tabela 4), com um valor médio de 0,67. Estes valores são extremamente baixos, sugerindo que a estirpe resistente desenvolvida apresenta diferenças não só fenotípicas mas também genotípicas. Os resultados sugerem também que o parasita consegue rapidamente adaptar-se ao fármaco, desenvolvendo resistência/tolerância ao PZQ, o que poderá explicar o crescente número de casos humanos reportados de insucesso terapêutico.

4. Discussão e conclusão

Após confirmação da existência de polimorfismos entre a estirpe sensível e resistente fomos observar o envolvimento das bombas P-gp na resistência/tolerância ao PZQ da nossa estirpe, uma vez que estas estão normalmente associadas a fenómenos de resistência em diversos organismos.

A actividade das bombas de efluxo nos machos da estirpe de *S. mansoni* resistente ao PZQ foi observada por microscopia de fluorescência e comparada com a estirpe sensível parental, sendo avaliada pela acumulação de Brometo de Etídio no parasita, acumulação esta que se traduz na intensidade de fluorescência. Este ensaio foi apenas realizado nos machos, não sendo possível realiza-lo nas fêmeas uma vez que o Brometo de Etídio se liga inespecificamente ao sangue presente no intestino das fêmeas não permitindo distinguir diferenças na presença e ausência de inibidores de efluxo (4).

Nos machos sensíveis a exposição a 1 µg/mL de Verapamil, uma hora antes da adição de Brometo de Etídio, levou a um aumento elevado da fluorescência em relação aos parasitas que não foram expostos ao inibidor (Figura 7 e Figura 9), estas observações sugerem que o Verapamil inibiu o efluxo do Brometo de Etídio, a reversão deste aumento de fluorescência após a adição de CaCl₂ vem reforçar estes dados pois sabe-se que o CaCl₂ vai ligar-se às bombas P-gp inibindo o efeito do Verapamil (94, 96, 98, 106).

Na estirpe resistente, após a exposição a 1 µg/mL de Verapamil, não se observou uma acumulação significativa de Brometo de Etídio (Figura 8 e Figura 10), no entanto quando foi testada uma concentração mais elevada de inibidor (2 µg/mL) (Figura 11), já foi possível observar acumulação de Brometo de Etídio, contudo mesmo utilizando o dobro da concentração de Verapamil da utilizada nos machos da estirpe sensível esta acumulação foi menor e menos acentuada, estes dados sugerem que os machos da estirpe resistente possuem maior número de bombas P-gp. Trabalhos publicados por outros autores (27, 87, 124, 132) quantificam o gene *SmMDR2* por qPCR, mostrando que existe uma maior expressão deste gene em isolados de estirpes resistentes, pelo que os resultados obtidos neste ensaio de acumulação de Brometo reforçam a existência de uma sobre-expressão de bombas P-gp em estirpes resistentes e apontando para o envolvimento destas na fármaco-resistência.

4. Discussão e conclusão

Com o intuito de verificar se esta sobre-expressão das bombas de efluxo estará envolvida na fármaco-resistência ao PZQ realizou-se um ensaio de cultura de *S. mansoni in vitro*, de forma a avaliar a susceptibilidade dos parasitas adultos de ambas as estirpes ao PZQ na presença e ausência de Verapamil.

Os machos da estirpe sensível na ausência de inibidor atingiram uma DL50 quando expostos a 5,558 µg/mL de PZQ, uma DL90 quando expostos a 7,548 µg/mL de PZQ e uma DL99 quando expostos a 9,687 µg/mL de PZQ (Tabela 6 e Figura 11). Quando expostos ao Verapamil, foi possível observar uma redução na quantidade de PZQ necessária para atingir as doses letais anteriormente mencionadas, indicando que as bombas de efluxo têm algum envolvimento na capacidade do parasita tolerar o PZQ. Outros estudos já haviam reportado que a acção bloqueadora das P-gps provocada pelo Verapamil, aumenta a susceptibilidade farmacológica de *C. elegans*, *Haemonchus contortus* e de *Cooperia oncophora* (121, 133). Os resultados obtidos mostram que, tal como nos helmintas anteriormente referidos, a presença de Verapamil aumenta a susceptibilidade dos machos de *S. mansoni* ao PZQ, indicando que as P-gps desempenham um papel importante na capacidade do parasita eliminar o fármaco.

Os machos da estirpe resistente na ausência de inibidor atingiram uma DL50 quando expostos a 20,356 µg/mL de PZQ, uma DL90 quando expostos a 30.658 µg/mL de PZQ e uma DL99 quando expostos a 42.809 µg/mL de PZQ (Tabela 7 e Figura 12). Quando expostos ao Verapamil, foi possível observar uma redução na quantidade de PZQ necessária para atingir as doses letais anteriormente mencionadas. Na presença de 0,5 µg/mL de Verapamil, a concentração mais baixa testada nesta estirpe, observou-se que as concentrações de PZQ necessárias para atingir as mesmas doses letais são aproximadamente duas vezes inferiores às do grupo de parasitas não expostos a inibidor. É ainda possível observar, comparando com o gráfico da estirpe sensível, que a susceptibilidade ao PZQ na estirpe resistente na presença das restantes concentrações de Verapamil apresenta valores próximos, ou mesmo inferiores aos dos parasitas da estirpe sensível que não foram expostos a inibidor, para as respectivas doses letais. Ardelli e Prichard (121) demonstraram que uma estirpe de *C. elegans* resistente à Ivermectina, na presença de Verapamil, apresenta um aumento da susceptibilidade ao fármaco, mostrando o seu envolvimento na resistência ao fármaco. Os resultados obtidos mostram que, tal

4. Discussão e conclusão

como na estirpe resistente de *C. elegans*, na nossa estirpe resistente de *S. mansoni*, as bombas P-gp têm um grande envolvimento na resistência dos machos ao PZQ e que a sua inibição reverte a capacidade do parasita resistir ao fármaco. Este conhecimento é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento desta parasitose, possibilitando o desenvolvimento de novas abordagens de terapia combinada de PZQ e inibidores P-gp aumentando assim o sucesso do tratamento ou na pesquisa de novos fármacos que actuem de forma mais eficaz contra estes parasitas.

As fêmeas da estirpe sensível na ausência de inibidor atingiram uma DL50 quando expostas a 64,047 µg/mL, uma DL90 quando expostas a 72,115 µg/mL de PZQ e uma DL99 quando expostas a 79,440 µg/mL de PZQ (Tabela 8 e Figura 13). Quando expostas a 2 µg/mL de Verapamil, não se observaram diferenças estatisticamente significativas na susceptibilidade ao PZQ, sendo as doses letais na presença do inibidor 63,967 µg/mL de PZQ para a DL50, 73,383 µg/mL de PZQ para a DL90, e 79,031 µg/mL de PZQ para a DL99. Estes resultados apontam então que a expressão das bombas P-gp não está envolvida na tolerância das fêmeas ao PZQ. Os resultados mostram ainda que as fêmeas da estirpe sensível são menos susceptíveis ao PZQ, não só em relação aos machos da estirpe sensível, mas também em relação aos machos da estirpe resistente. Esta maior tolerância das fêmeas já havia sido descrita noutros trabalhos (27, 66, 87) onde as fêmeas resistem a concentrações consideravelmente mais altas do que os machos, sendo por isso, frequentemente, o fenótipo de resistência associado aos machos, que passam a tolerar concentrações superiores de PZQ e não às fêmeas que são naturalmente mais tolerantes ao fármaco, não só *in vitro* como também *in vivo* (64, 68, 74-77).

As fêmeas da estirpe resistente foram expostas a concentrações até 900 µg/mL de PZQ no entanto, dentro das concentrações testadas, não se conseguiu encontrar as doses letais, tanto na ausência como na presença de Verapamil. Os trabalhos de fármaco-resistência (1, 27, 87, 123, 124, 132) normalmente focam o aumento de tolerância dos machos pois, como foi dito anteriormente, é a estes que o fenótipo de resistência se encontra associado. Estes trabalhos publicados referem que não foram encontrados alterações no fenótipo das fêmeas, no entanto esse não aparenta ter sido o caso da nossa estirpe que parece ter desenvolvido uma maior tolerabilidade ao PZQ. Contudo, é de notar que, num ensaio *in vitro*, não é possível ter em consideração a interacção entre os efeitos provocados pelo

4. Discussão e conclusão

fármaco e a acção do sistema imunitário do hospedeiro definitivo sobre o parasita, sendo este um factor de grande importância no tratamento desta parasitose (11, 39, 66). Outro factor a ter em consideração é o facto de as observações terem sido efectuadas durante 72 h pelo que não temos em conta os efeitos do fármaco a longo prazo. Estes dois factores podem ter uma grande influência na capacidade de resistência dos parasitas ao PZQ, pelo que este aparente aumento de tolerância das fêmeas da estirpe resistente pode na realidade ser mais reduzido, ou inexistente quando a comparação é feita *in vivo*.

Quando se observou a expressão do gene *SmMDR2* as fêmeas apresentam um valor de expressão do gene *SmMDR2* aproximadamente 4 vezes mais elevado que os machos, no entanto quando expostos ao PZQ a expressão de *SmMDR2* nos machos aumentou 17 vezes em relação à expressão na ausência de PZQ (Figura 14); as fêmeas, no entanto, não tiveram um aumento significativo de expressão, estando estes resultados de acordo com outros trabalhos onde a expressão do *SmMDR2* nas fêmeas é superior à dos machos antes da exposição ao fármaco, havendo um aumento acentuado na expressão do gene nos machos após a exposição ao PZQ, tendo assim valores de expressão mais elevados do que as fêmeas que não sofrem um aumento significativo da expressão deste gene (1, 27, 87, 123, 124, 132). Os resultados do qPCR sugerem que as bombas P-gp têm de facto um papel importante na resposta dos machos de *S. mansoni* ao PZQ, no entanto também sugerem que nas fêmeas as bombas P-gp não têm um envolvimento significativo na resposta ao fármaco.

Os machos da estirpe resistente apresentaram, na ausência de fármaco, uma expressão de *SmMDR2* 32 vezes superior ao dos machos da estirpe sensível. Após a exposição ao PZQ os machos da estirpe resistente apresentaram uma expressão de *SmMDR2* aproximadamente 6 vezes superior à expressão do gene na ausência de fármaco, sobre-expressão que já havia sido detectada numa estirpe de *S. mansoni* com susceptibilidade baixa (124). Estes resultados vêm reforçar a hipótese de haver uma sobre-expressão das bombas P-gps nos machos da estirpe resistente e que esta sobre-expressão está envolvida no aumento de tolerância/resistência ao PZQ.

As fêmeas da estirpe resistente não tiveram alterações significativas na expressão de *SmMDR2* após a exposição ao PZQ, sendo a expressão aproximadamente 10 vezes inferior à das fêmeas da estirpe sensível. Estes dados sugerem que as bombas P-gp não

4. Discussão e conclusão

estão envolvidas na tolerância/resistência das fêmeas ao PZQ, no entanto tem de se ter em consideração que apenas se conhece um tipo de P-gp em *Schistosoma*, não se podendo excluir a possibilidade da existência de mais de um tipo de P-gp como acontece em diversos helmintas. Contudo quando analisamos estes resultados em conjunto com os resultados obtidos na cultura *in vitro*, eles parecem suportar mais a hipótese que as bombas P-gp não têm um envolvimento significativo na tolerância/resistência das fêmeas ao PZQ. Esta hipótese também é suportada por outros trabalhos publicados (27, 124, 132) em que é efectuado a detecção e quantificação, por *Western-Blot*, de P-gps indicando que as bombas existem em menor quantidade nas fêmeas de *Schistosoma* spp.

Com base nos resultados obtidos é possível, de facto verificar que a sobre-expressão das bombas P-gp está fortemente relacionada com a tolerância/ resistência dos machos ao PZQ, no entanto levanta-se a questão, de que forma estas estarão envolvidas. Num trabalho publicado por Kasinathan *et al* (132), tentaram compreender se as bombas P-gp seriam alvos terapêuticos do PZQ ou se transportadoras deste fármaco. Para responder a esta questão os autores clonaram cDNA *SmMDR2* em células de ovário de hamster e realizaram testes de acumulação da rodamina na presença e ausência de PZQ, concluindo que ser pouco provável que as P-gp sejam o alvo terapêutico do PZQ, sendo mais provável responsáveis pela remoção do fármaco do interior do parasita.

Concluindo, os dados obtidos neste trabalho sugerem que a espécie *S. mansoni* consegue criar uma tolerância/resistência ao PZQ e que a técnica de *RAPD-PCR* permite, efectivamente, identificar a diversidade genética associada a esta adaptação.

A actividade das bombas de efluxo nos machos da estirpe de *S. mansoni* resistente mostrou ser mais elevada que nos machos da estirpe sensível, sugerindo que os machos da estirpe resistente possuem maior número de bombas P-gp; este resultado foi reforçado pela sobre-expressão do gene *SmMDR2* dos machos da estirpe resistente em relação aos machos da estirpe sensível tanto na presença como na ausência de fármaco, indicando que a sobre-expressão de bombas P-gp estará associada aos machos da estirpe resistente.

Os resultados obtidos na cultura *in vitro* mostram que é possível aumentar a susceptibilidade dos machos da estirpe resistente ao inibir a actividade das bombas de

4. Discussão e conclusão

efluxo, confirmando que a a sobre-expressão de P-gps está directamente relacionada com o fenótipo de resistência dos machos aumentando a sua tolerância/resistência ao fármaco.

Os resultados obtidos nas fêmeas ao longo do trabalho indicam que estas, não só são mais resistentes que os machos, como a sua resistência não está associada às bombas P-gp mas sim a outros factores. Embora não tenhamos uma resposta para a tolerância natural das fêmeas ao PZQ, ao conhecermos os mecanismos associados à resistência nos machos, permitir-nos-á procurar soluções para aumentar as taxas de sucesso ao tratamento da patologia associada à schistosomose. Seria, no entanto, interessante compreender os mecanismos das fêmeas na resposta ao PZQ de forma a poder criar estratégias de tratamento e controlo mais eficazes.

Este trabalho representa uma primeira etapa no estudo do fenótipo de resistência ao PZQ. Para futuros trabalhos seria interessante estudar a actividade de outros inibidores de bombas de efluxo assim como realizar estudos de proteómica com o intuito de encontrar outras proteínas que possam contribuir para este fenótipo. Seria também interessante realizar ensaios *in vivo* com o objetivo de analisar o envolvimento do sistema imunitário do hospedeiro definitivo nos parasitas expostos ao PZQ e na presença de inibidores, assim como conhecer esses efeitos na carga parasitária durante períodos mais longos de tempo.

A Organização Mundial de Saúde alerta para o aparecimento de populações de *Schistosoma* spp. resistentes ao PZQ e recomenda uma constante vigilância (19), pelo que este e outros estudos são de extrema importância para a compreensão do(s) potenciais mecanismo(s) de tolerância/resistência ao PZQ, contribuindo para o desenvolvimento de novos schistosomicidas e para a delineação de novas estratégias de controlo da schistosomose.

4. Discussão e conclusão

5. Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

1. Messerli SM, Kasinathan RS, Morgan W, Spranger S, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to Praziquantel exposure and correlate with reduced Praziquantel susceptibility. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2009;167(1):54-9.
2. Thetiot-Laurent SA, Boissier J, Robert A, Meunier B. Schistosomiasis chemotherapy. *Angewandte Chemie*. 2013;52(31):7936-56.
3. van Hellemond JJ, van Balkom BW, Tielens AG. Schistosome biology and proteomics: progress and challenges. *Experimental Parasitol*. 2007;117(3):267-74.
4. Davis A. Helminthic Infections. In: Cook CZ, A., editor. *Manson's Tropical Diseases*. Rinchoa: Técnico Científicas, LDA; 2003. p. 1431-63.
5. Lawton SP, Hirai H, Ironside JE, Johnston DA, Rollinson D. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasites & vectors*. 2011;4:131.
6. Zhao GH, Li J, Blair D, Li XY, Elsheikha HM, Lin RQ, et al. Biotechnological advances in the diagnosis, species differentiation and phylogenetic analysis of *Schistosoma* spp. *Biotechnology advances*. 2012;30(6):1381-9.
7. Han ZG, Brindley PJ, Wang SY, Chen Z. *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annual review of genomics and human genetics*. 2009;10:211-40.
8. Osada Y, Janecharut T, Hata H, Mahakunkij-Charoen Y, Chen XW, Nara T, et al. Protective immunity to *Schistosoma japonicum* infection depends on the balance of T helper cytokine responses in mice vaccinated with gamma-irradiated cercariae. *Parasite immunology*. 2001;23(5):251-8.
9. Reda ES, Ouhtit A, Abdeen SH, El-Shabasy EA. Structural changes of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from C57BL/6 mice treated with radiation-attenuated vaccine and/or Praziquantel against infection. *Parasitology research*. 2012;110(2):979-92.
10. Reimert CM, Tukahebwa EM, Kabatereine NB, Dunne DW, Vennervald BJ. Assessment of *Schistosoma mansoni* induced intestinal inflammation by means of eosinophil cationic protein, eosinophil protein X and myeloperoxidase before and after treatment with Praziquantel. *Acta tropica*. 2008;105(3):253-9.
11. Aly IR, Hendawy MA, Ali E, Hassan E, Nosseir MM. Immunological and parasitological parameters after treatment with dexamethasone in murine *Schistosoma mansoni*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010;105(6):729-35.
12. WHO. Weekly epidemiologic record. World Health Organ 2014.
13. Adamson PB. Schistosomiasis in antiquity. *Medical history*. 1976;20(2):176-88.

5. Referências Bibliográficas

14. Manson P. Report of a Case of Bilharzia from the West Indies. British medical journal. 1902;2(2190):1894-5.
15. Paraense WL. História do *Schistosoma mansoni*. In: Fiocruz, editor. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Manguinhos; 2008. p. 31-41.
16. Blair D, van Herwerden L, Hirai H, Taguchi T, Habe S, Hirata M, et al. Relationships between *Schistosoma malayensis* and other Asian schistosomes deduced from DNA sequences. Molecular and Biochemical Parasitology 1997;85(2):259-63.
17. Katz N, Coelho PM. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: the Brazilian contribution. Acta tropica. 2008;108(2-3):72-8.
18. Raso G, N'Goran EK, Toty A, Luginbuhl A, Adjoua CA, Tian-Bi NT, et al. Efficacy and side effects of Praziquantel against *Schistosoma mansoni* in a community of western Cote d'Ivoire. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2004;98(1):18-27.
19. Wang W, Wang L, Liang YS. Susceptibility or resistance of Praziquantel in human schistosomiasis: a review. Parasitology research. 2012;111(5):1871-7.
20. Horak P, Kolarova L. Bird schistosomes: do they die in mammalian skin? Trends in parasitology. 2001;17(2):66-9.
21. Machado JRG, S. Filogenia, co.evolução, aspectos morfológicos e Biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: Fiocruz, editor. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Manguinhos; 2008. p. 44-84.
22. WHO. Schistosomiasis: PROGRESS REPORT 2001–2011 AND STRATEGIC PLAN 2012–2020. World Health Organ 2013.
23. Tait A. Genetics and genomics converge on the human blood fluke. Genome biology. 2009;10(6):225.
24. Ximenes RA, Southgate B, Smith PG, Guimaraes Neto L. Social environment, behavior, and schistosomiasis in an urban population in the northeast of Brazil. Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health. 2001;9(1):13-22.
25. Bergquist R. A century of schistosomiasis research. Acta tropica. 2008;108(2-3):65-8.
26. Kasinathan RS, Morgan WM, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (*SmMRP1*) in juvenile worms and in response to Praziquantel. Molecular and Biochemical Parasitology 2010;173(1):25-31.

5. Referências Bibliográficas

27. Kasinathan RS, Morgan WM, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (*SmMRP1*) in juvenile worms and in response to Praziquantel. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2010;173(1):25-31.
28. Shu-Hua X, Utzinger J, Chollet J, Tanner M. Effect of artemether administered alone or in combination with Praziquantel to mice infected with *Plasmodium berghei* or *Schistosoma mansoni* or both. *International journal for parasitology*. 2006;36(8):957-64.
29. Correa-Oliveira R, Caldas IR, Gazzinelli G. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology Today*. 2000;16(9):397-9.
30. Teodoro TM, Jannotti-Passos LK, Carvalho Odos S, Grijalva MJ, Baus EG, Caldeira RL. Hybridism between *Biomphalaria cousini* and *Biomphalaria amazonica* and its susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106(7):851-5.
31. Mone H, Minguez S, Ibikounle M, Allienne JF, Massougbojji A, Mouahid G. Natural Interactions between *S. haematobium* and *S. guineensis* in the Republic of Benin. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:793420.
32. Ferrari TC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Immune response and pathogenesis of neuroschistosomiasis mansoni. *Acta tropica*. 2008;108(2-3):83-8.
33. Stich AH, Biays S, Odermatt P, Men C, Saem C, Sokha K, et al. Foci of *Schistosomiasis mekongi*, Northern Cambodia: II. Distribution of infection and morbidity. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 1999;4(10):674-85.
34. Parker-Manuel SJ, Ivens AC, Dillon GP, Wilson RA. Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(8):e1274.
35. Silva CS, Silva SH, Pereira-Junior OS, Cabral FJ, Costa-Cruz JM, Rodrigues V. *Schistosoma mansoni*: gene expression of the nucleotide excision repair factor 2 (NEF2) during the parasite life cycle, and in adult worms after exposure to different DNA-damaging agents. *Acta tropica*. 2007;104(1):52-62.
36. Galvan AG, Paugam M, Sullivan JT. Rescue of sporocysts of *Schistosoma mansoni* in nonsusceptible *Biomphalaria* by head-foot transplantation into susceptible snails. *The Journal of parasitology*. 2000;86(2):308-11.
37. Kapp K, Coustau C, Wipperfsteg V, Jourdane J, Kunz W, Grevelding CG. Transplantation of in vitro-generated *Schistosoma mansoni* mother sporocysts into *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology research*. 2003;91(6):482-5.
38. Collins JJ, 3rd, King RS, Cogswell A, Williams DL, Newmark PA. An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(3):e1009.

5. Referências Bibliográficas

39. Bin Dajem SM, Mostafa OM, El-Said FG. Susceptibility of two strains of mice to the infection with *Schistosoma mansoni*: parasitological and biochemical studies. *Parasitology research*. 2008;103(5):1059-63.
40. Gryseels B, Nkulikyinka L. The distribution of *Schistosoma mansoni* in the Rusizi plain (Burundi). *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1988;82(6):581-90.
41. Hams E, Aviello G, Fallon PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Frontiers in immunology*. 2013;4:89.
42. Zanotti-Magalhaes EM, Magalhaes LA, de Carcalho JF. [Relationship between pathogenicity of *Schistosoma mansoni* in mice and the susceptibility of the vector mollusk. IV--Infectiousness of miracidia]. *Revista de saude publica*. 1997;31(5):488-94.
43. Ernould JC, Ba K, Sellin B. Increase of intestinal schistosomiasis after Praziquantel treatment in a *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* mixed focus. *Acta tropica*. 1999;73(2):143-52.
44. Rollinson D, Stothard JR, Jones CS, Lockyer AE, de Souza CP, Noble LR. Molecular characterisation of intermediate snail hosts and the search for resistance genes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93 Suppl 1:111-6.
45. Xiaonong Z, Minggang C, McManus D, Bergquist R. Schistosomiasis control in the 21st century. *Proceedings of the International Symposium on Schistosomiasis, Shanghai, July 4-6, 2001*. *Acta tropica*. 2002;82(2):95-114.
46. DeJong RJ, Morgan JA, Paraense WL, Pointier JP, Amarista M, Ayeh-Kumi PF, et al. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular biology and evolution*. 2001;18(12):2225-39.
47. JØRgensen A, Kristensen TK, Stothard JR. Phylogeny and biogeography of African *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae), with emphasis on endemic species of the great East African lakes. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2007;151(2):337-49.
48. Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Carvalho OS. Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: a review of the identification of species and the detection of infected snails. *Acta tropica*. 2009;111(1):1-6.
49. Campbell G, Jones CS, Lockyer AE, Hughes S, Brown D, Noble LR, et al. Molecular evidence supports an african affinity of the neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2000;267(1460):2351-8.
50. Andrade ZA. A patologia da esquistossomose humana. In: Fiocruz, editor. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Manguinhos; 2008. p. 547-67.

5. Referências Bibliográficas

51. Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta tropica*. 2008;108(2-3):109-17.
52. Polman K, de Vlas SJ, Gryseels B, Deelder AM. Relating serum circulating anodic antigens to faecal egg counts in *Schistosoma mansoni* infections: a modelling approach. *Parasitology*. 2000;121 Pt 6:601-10.
53. Rabello AL, Rocha RS, de Oliveira JP, Katz N, Lambertucci JR. Stool examination and rectal biopsy in the diagnosis and evaluation of therapy of schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1992;34(6):601-8.
54. Massoud A, Nikbin B, Nazari GR, Syadat NA, Ala F. A study of cell-mediated immunity and histocompatibility antigens in leprosy patients in Iran. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1978;46(2):149-53.
55. Noya O, Alarcon de Noya B, Losada S, Colmenares C, Guzman C, Lorenzo MA, et al. Laboratory diagnosis of Schistosomiasis in areas of low transmission: a review of a line of research. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97 Suppl 1:167-9.
56. Barber KE, Mkoji GM, Loker ES. PCR-RFLP analysis of the ITS2 region to identify *Schistosoma haematobium* and *S. bovis* from Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000;62(4):434-40.
57. Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;66(2):157-62.
58. ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(2):179-85.
59. Hines-Kay J, Cupit PM, Sanchez MC, Rosenberg GH, Hanelt B, Cunningham C. Transcriptional analysis of *Schistosoma mansoni* treated with Praziquantel in vitro. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2012;186(2):87-94.
60. Pica-Mattoccia L, Doenhoff MJ, Valle C, Basso A, Troiani AR, Liberti P, et al. Genetic analysis of decreased Praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. *Acta tropica*. 2009;111(1):82-5.
61. Bin Dajem SM, Ibrahim EH, Al-Quraishy SA, Mostafa OM. Fingerprint of *Biomphalaria arabica*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Saudi Arabia, using RAPD-PCR. *Gene*. 2011;485(2):69-72.
62. Shalaby I, Gherbawy Y, Banaja A. Genetic diversity among *Schistosoma mansoni* population in the western region of Saudi Arabia. *Tropical biomedicine*. 2011;28(1):90-101.

5. Referências Bibliográficas

63. Sire C, Durand P, Pointier JP, Theron A. Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*): infrapopulation differentiation at microspatial scale. *International journal for parasitology*. 2001;31(14):1609-16.
64. Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to Praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;96(5):465-9.
65. Fallon PG, Tao LF, Ismail MM, Bennett JL. Schistosome resistance to Praziquantel: Fact or artifact? *Parasitology Today*. 1996;12(8):316-20.
66. Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* Praziquantel treatment. *International journal for parasitology*. 2004;34(4):527-33.
67. Utzinger J, Chollet J, Tu Z, Xiao S, Tanner M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;96(3):318-23.
68. Wu W, Wang W, Huang YX. New insight into Praziquantel against various developmental stages of schistosomes. *Parasitology research*. 2011;109(6):1501-7.
69. Bina JC. O tratamento específico como arma no controle da esquistossomose. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1992;87:195-202.
70. Boisier P, Ramarokoto CE, Ravaoalimalala VE, Rabarijaona L, Serieye J, Roux J, et al. Reversibility of *Schistosoma mansoni*-associated morbidity after yearly mass Praziquantel therapy: ultrasonographic assessment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;92(4):451-3.
71. Zhou YB, Zhao GM, Jiang QW. Effects of the Praziquantel-based control of schistosomiasis japonica in China. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2007;101(8):695-703.
72. Chai JY. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. *Infection & chemotherapy*. 2013;45(1):32-43.
73. Favre TC, Pereira AP, Galvao AF, Zani LC, Barbosa CS, Pieri OS. A rationale for schistosomiasis control in elementary schools of the rainforest zone of pernambuco, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2009;3(3):e395.
74. Lamberton PH, Hogan SC, Kabatereine NB, Fenwick A, Webster JP. *In vitro* Praziquantel test capable of detecting reduced *in vivo* efficacy in *Schistosoma mansoni* human infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;83(6):1340-7.

5. Referências Bibliográficas

75. Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to Praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1994;51(1):83-8.
76. Ismail MM, Taha SA, Farghaly AM, el-Azony AS. Laboratory induced resistance to Praziquantel in experimental schistosomiasis. Journal of the Egyptian Society of Parasitology. 1994;24(3):685-95.
77. Liang YS, Li HJ, Dai JR, Wang W, Qu GL, Tao YH, et al. [Studies on resistance of Schistosoma to Praziquantel XIII resistance of *Schistosoma japonicum* to Praziquantel is experimentally induced in laboratory]. Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi = Chinese journal of schistosomiasis control. 2011;23(6):605-10.
78. Bonesso-Sabadini PI, de Souza Dias LC. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and Praziquantel. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002;97(3):381-5.
79. Danso-Appiah A, De Vlas SJ. Interpreting low Praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. Trends in parasitology. 2002;18(3):125-9.
80. Lawn SD, Lucas SB, Chiodini PL. Case report: *Schistosoma mansoni* infection: failure of standard treatment with Praziquantel in a returned traveller. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2003;97(1):100-1.
81. Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, Wynn NB, et al. Reduced susceptibility to Praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2009;3(8):e504.
82. Alonso D, Munoz J, Gascon J, Valls ME, Corachan M. Failure of standard treatment with Praziquantel in two returned travelers with *Schistosoma haematobium* infection. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2006;74(2):342-4.
83. Herwaldt BL, Tao LF, van Pelt W, Tsang VC, Bruce JI. Persistence of *Schistosoma haematobium* infection despite multiple courses of therapy with Praziquantel. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1995;20(2):309-15.
84. Midzi N, Sangweme D, Zinyowera S, Mapingure MP, Brouwer KC, Kumar N, et al. Efficacy and side effects of Praziquantel treatment against *Schistosoma haematobium* infection among primary school children in Zimbabwe. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2008;102(8):759-66.
85. Silva IM, Pereira Filho E, Thiengo R, Ribeiro PC, Conceicao MJ, Panasco M, et al. Schistosomiasis haematobia: histopathological course determined by cystoscopy in a patient in whom Praziquantel treatment failed. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2008;50(6):343-6.
86. Silva IM, Thiengo R, Conceicao MJ, Rey L, Lenzi HL, Pereira Filho E, et al. Therapeutic failure of Praziquantel in the treatment of *Schistosoma haematobium*

5. Referências Bibliográficas

infection in Brazilians returning from Africa. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100(4):445-9.

87. Liang YS, Wang W, Dai JR, Li HJ, Tao YH, Zhang JF, et al. Susceptibility to Praziquantel of male and female cercariae of Praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. *Journal of helminthology*. 2010;84(2):202-7.

88. WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. World Health Organization Technical Report Ser. 2002;912:i - vi.

89. Ambudkar SV, Kim IW, Sauna ZE. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (*ABCB1*). *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2006;27(5):392-400.

90. Aouali N, Eddabra L, Macadre J, Morjani H. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2005;56(1):61-70.

91. Sui H, Fan ZZ, Li Q. Signal Transduction Pathways and Transcriptional Mechanisms of *ABCB1*/Pgp-mediated Multiple Drug Resistance in Human Cancer Cells. *Journal of International Medical Research*. 2012;40(2):426-35.

92. Ponte-Sucre A. Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Applied microbiology and biotechnology*. 2007;76(2):279-86.

93. Sauna ZE, Ambudkar SV. About a switch: how P-glycoprotein (*ABCB1*) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(1):13-23.

94. Prajapati R, Singh U, Patil A, Khomane KS, Bagul P, Bansal AK, et al. *In silico* model for P-glycoprotein substrate prediction: insights from molecular dynamics and *in vitro* studies. *Journal of computer-aided molecular design*. 2013;27(4):347-63.

95. Balayssac D, Authier N, Cayre A, Coudore F. Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions? *Toxicology letters*. 2005;156(3):319-29.

96. Breier A, Gibalova L, Seres M, Barancik M, Sulova Z. New insight into p-glycoprotein as a drug target. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2013;13(1):159-70.

97. Sharom FJ. Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Frontiers in oncology*. 2014;4:41.

98. Feldmann M, Koepp M. P-glycoprotein imaging in temporal lobe epilepsy: in vivo PET experiments with the Pgp substrate [11C]-Verapamil. *Epilepsia*. 2012;53 Suppl 6:60-3.

99. Xiang QF, Zhang DM, Wang JN, Zhang HW, Zheng ZY, Yu DC, et al. Cabozantinib reverses multidrug resistance of human hepatoma HepG2/adr cells by

5. Referências Bibliográficas

modulating the function of P-glycoprotein. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2014.

100. Sharma V. Radiopharmaceuticals for assessment of multidrug resistance P-glycoprotein-mediated drug transport activity. *Bioconjugate chemistry*. 2004;15(6):1464-74.

101. Amiri-Kordestani L, Basseville A, Kurdziel K, Fojo AT, Bates SE. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2012;15(1-2):50-61.

102. Aronica E, Sisodiya SM, Gorter JA. Cerebral expression of drug transporters in epilepsy. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64(10):919-29.

103. Tomkiewicz D, Casadei G, Larkins-Ford J, Moy TI, Garner J, Bremner JB, et al. Berberine-INF55 (5-nitro-2-phenylindole) hybrid antimicrobials: effects of varying the relative orientation of the berberine and INF55 components. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(8):3219-24.

104. Loscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in neurobiology*. 2005;76(1):22-76.

105. Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Lee OR, Mravec J, Sauer M, Titapiwatanakun B, et al. Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 1):137-41.

106. Achilli TM, McCalla S, Meyer J, Tripathi A, Morgan JR. Multilayer Spheroids To Quantify Drug Uptake and Diffusion in 3D. *Molecular pharmaceutics*. 2014.

107. Lespine A, Menez C, Bourguinat C, Prichard RK. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International journal for parasitology -- drugs and drug resistance*. 2012;2:58-75.

108. Kerboeuf D. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003;22(3):332-46.

109. Brennan GP, Fairweather I, Trudgett A, Hoey E, McCoy, McConville M, et al. Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and molecular pathology*. 2007;82(2):104-9.

110. Stitt LE, Tompkins JB, Dooley LA, Ardelli BF. ABC transporters influence sensitivity of *Brugia malayi* to moxidectin and have potential roles in drug resistance. *Experimental Parasitology*. 2011;129(2):137-44.

111. Tompkins JB, Stitt LE, Morrisette AM, Ardelli BF. The role of *Brugia malayi* ATP-binding cassette (ABC) transporters in potentiating drug sensitivity. *Parasitology research*. 2011;109(5):1311-22.

5. Referências Bibliográficas

112. James CE, Hudson AL, Davey MW. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends in parasitology*. 2009;25(7):328-35.
113. Kumkate S, Chunchob S, Janvilisri T. Expression of ATP-binding cassette multidrug transporters in the giant liver fluke *Fasciola gigantica* and their possible involvement in the transport of bile salts and anthelmintics. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008;317(1-2):77-84.
114. Jones PM, George AM. Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. *International journal for parasitology*. 2005;35(5):555-66.
115. Wilkinson R, Law CJ, Hoey EM, Fairweather I, Brennan GP, Trudgett A. An amino acid substitution in *Fasciola hepatica* P-glycoprotein from triclabendazole-resistant and triclabendazole-susceptible populations. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2012;186(1):69-72.
116. Bartikova H, Vokral I, Kubicek V, Szotakova B, Prchal L, Lamka J, et al. Import and efflux of flubendazole in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Veterinary parasitology*. 2012;187(3-4):473-9.
117. Lanusse C, Alvarez L, Lifschitz A. Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants. *Veterinary parasitology*. 2013.
118. Riou M, Koch C, Kerboeuf D. Increased resistance to anthelmintics of *Haemonchus contortus* eggs associated with changes in membrane fluidity of eggshells during embryonation. *Parasitology research*. 2005;95(4):266-72.
119. Savage J, Meaney M, Brennan GP, Hoey E, Trudgett A, Fairweather I. Increased action of triclabendazole (TCBZ) in vitro against a TCBZ-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-incubation with the P-glycoprotein inhibitor, R(+)-Verapamil. *Experimental Parasitology*. 2013;135(3):642-53.
120. Riou M, Koch C, Delaleu B, Berthon P, Kerboeuf D. Immunolocalisation of an ABC transporter, P-glycoprotein, in the eggshells and cuticles of free-living and parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasitology research*. 2005;96(3):142-8.
121. Ardelli BF, Prichard RK. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Veterinary parasitology*. 2013;191(3-4):264-75.
122. Kasinathan RS, Morgan WM, Greenberg RM. Genetic Knockdown and Pharmacological Inhibition of Parasite Multidrug Resistance Transporters Disrupts Egg Production in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(12):e1425.
123. Greenberg RM. ABC multidrug transporters in schistosomes and other parasitic flatworms. *Parasitology International*. 2013;62(6):647-53.

5. Referências Bibliográficas

124. Kasinathan RS, Greenberg RM. Pharmacology and potential physiological significance of schistosome multidrug resistance transporters. *Experimental Parasitology*. 2012;132(1):2-6.
125. Gennari Sm, Kasai N, Pena Hfdj, Cortez A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 1999;36:0-.
126. Stothard JR, Hughes S, Rollinson D. Variation within the internal transcribed spacer (*ITS*) of ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Acta tropica*. 1996;61(1):19-29.
127. Tsai MH, Marx KA, Ismail MM, Tao L. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction assay for identification of *Schistosoma mansoni* strains sensitive or tolerant to anti-schistosomal drugs. *The Journal of parasitology*. 2000;86(1):146-9.
128. Oliveira AL, Da Silva D, Zanotti-Magalhaes EM, Abdel-Hamid AZ, Ribeiro-Paes JT. Schistosome/mollusk: genetic compatibility. *Genetics and molecular research : GMR*. 2008;7(2):518-26.
129. Spada RG, da Silva D, Abdel-Hamid AZ, Sobral-Hamaguchi SS, Zuim NR, Zanotti-Magalhaes EM, et al. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97 Suppl 1:53-8.
130. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J. High-throughput real-time PCR. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2008;429:89-98.
131. Barral V, This P, Imbert-Establet D, Combes C, Delseny M. Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome analysed by using random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Biochemical Parasitology*. 1993;59(2):211-21.
132. Kasinathan RS, Goronga T, Messerli SM, Webb TR, Greenberg RM. Modulation of a *Schistosoma mansoni* multidrug transporter by the antischistosomal drug Praziquantel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(1):128-35.
133. Kerboeuf D, Guegnard F, Le Vern Y. Analysis and partial reversal of multidrug resistance to anthelmintics due to P-glycoprotein in *Haemonchus contortus* eggs using *Lens culinaris* lectin. *Parasitology research*. 2002;88(9):816-21.
134. Cioli D, Botros SS, Wheatcroft-Francklow K, Mbaye A, Southgate V, Tchuente LA, et al. Determination of ED50 values for Praziquantel in Praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *International journal for parasitology*. 2004;34(8):979-87.